



TITLE:

コムギおよびライムギにおけるベンゾキサジノン生合成酵素の動態と性状解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

須恵, 雅之

CITATION:

須恵, 雅之. コムギおよびライムギにおけるベンゾキサジノン生合成酵素の動態と性状解析. 京都大学, 2000, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2000-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3167385>

RIGHT:

コムギおよびライムギにおけるベンゾキサジノン生合成酵素
の動態と性状解析

2000 年

須恵 雅之

目次

序論	3
第一章 コムギ芽生えにおける HBOA およびインドール水酸化酵素の動態と性状解析	
1-1. 序論	6
1-2. 実験方法	
1-2-1. 植物材料および Hx 類の調製	8
1-2-2. ミクロソーム画分の調製	8
1-2-3. 酵素活性の測定	9
1-3. 結果	
1-3-1. コムギ芽生えにおける水酸化酵素活性	10
1-3-2. コムギ芽生えにおける P-450 活性の経時変化	11
1-4. 考察	13
第二章 コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼの精製と性状解析	
2-1. 序論	15
2-2. 実験方法	
2-3-1. 植物材料および Hx 類の調製	17
2-3-2. コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼの経時変化測定	17
2-3-3. グルコシルトランスフェラーゼの精製	18
2-3-4. 酵素活性の測定	18
2-3-5. 電気泳動	19
2-3. 結果	
2-3-1. コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼ活性の経時変化	20
2-3-2. コムギ芽生えからのグルコシルトランスフェラーゼの精製	21
2-3-3. グルコシルトランスフェラーゼの特性	23
2-4. 考察	26
第三章 コムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼの精製と性状解析	
3-1. 序論	29
3-2. 実験方法	

3-2-1. Hx 類の調製	31
3-2-2. 植物材料	31
3-2-3. β -グルコシダーゼの精製	31
3-2-4. 酵素活性測定	32
3-2-5. 電気泳動および N 末端アミノ酸配列の解析	33
3-3. 結果	
3-3-1. グルコシダーゼ活性のコムギ芽生えにおける動態	34
3-3-2. コムギ芽生えからのグルコシダーゼの精製	35
3-3-3. グルコシダーゼの基質特異性	38
3-3-4. グルコシダーゼアイソザイムの品種・種による発現パターンの比較	40
3-4. 考察	42
第四章 ライムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼの精製と性状解析	
4-1. 序論	45
4-2. 実験方法	
4-2-1. Hx 類の調製	46
4-2-2. 植物材料	46
4-2-3. β -グルコシダーゼの精製	46
4-2-4. 酵素活性測定	47
4-2-5. 電気泳動および N-末端アミノ線配列の解析	47
4-3. 結果	
4-3-1. 環状ヒドロキサム酸配糖体 (HxGlc) および HxGlc グルコシダーゼのライムギ芽生えにおける動態	48
4-3-2. ライムギ芽生えからの β -グルコシダーゼの精製	50
4-3-3. ライムギグルコシダーゼの性状解析	53
4-4. 考察	56
総括	59
引用文献	62
原著論文および関連論文	67
謝辞	68

序論

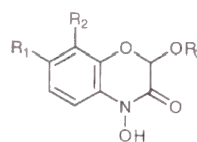
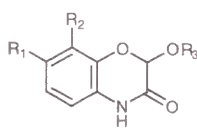
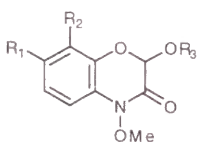
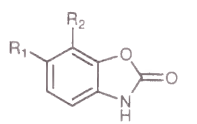
植物はフェニルプロパノイドやテルペンなど様々な二次代謝産物をその体内に蓄積しており、その構造や蓄積量などは植物種・生育時期・部位などにより異なっている。これら二次代謝物は植物体内において多様な生理的役割を担っているが、病害抵抗性発現に関わる機能などはその代表的なものである。傷害や感染などに対する植物の抵抗反応は、細胞壁の強化などといった物理的抵抗と抗菌物質の分泌などによる化学的抵抗の二つに大別することができる。このような植物の抵抗反応において、二次代謝産物は細胞壁の強化因子や情報伝達のためのシグナル物質となるだけでなく、それ自身が抗菌活性等を示し抵抗性発現に寄与する場合も多い。

コムギ・トウモロコシ・ライムギなどの主要穀物をはじめ、ダンチク・ジュズダマ・ハマニンニク・モロコシなど多くのイネ科植物に見られる環状ヒドロキサム酸類 (cyclic hydroxamic acid: Hx) は 1,4-benzoxazin-3-one (ベンゾキサジノン) を基本構造にもち、これら植物の化学的抵抗性に関与している [Niemeyer 1988] (双子葉植物ではハアザミでのみ報告がある)。Hx 類の生理活性としては、カビやバクテリアなどに対する抗菌活性、昆虫などに対する咬害忌避活性、他の植物に対する生育阻害活性、さらにはトリアジン系農薬の解毒活性やオーキシシンレセプターへの関与などが知られている。

Hx 類縁体としては次の表に示したような種々の置換パターンを持つ化合物が知られているが、この中で最も多量かつ普遍的に存在し、これら植物の耐病性を考える上で重要な化合物は 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA) および 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) の 2 種の Hx である。これら Hx 類は通常植物体内では化学的に安定な (不活性な) 2- β -O-グルコース配糖体として存在しており、傷害や感染時における組織の物理的破壊の際にグルコシダーゼの働きにより加水分解され、活性本体であるアグリコンが遊離する [Hofman and Hofmanová 1971, Niemeyer 1988]。先にも述べたとおり Hx 類の生理活性については様々なものが知られているが、細胞内レベルでの作用点に関する報告は細胞膜上の H⁺-ATPase、ミトコンドリアやクロロプラストの電子伝達系など少数があるのみである [Friebe *et al.* 1997, Massardo *et al.* 1994]。しかし、いずれに対しても阻害活性発現に必要なとされる濃度は mM レベルであるため、実際の感染防御反応においての作用点として機能しているかどうかは議論の余地が残るところである。

これら Hx 類は他の多くの二次代謝物と同様に、植物の品種や生育時期、そして組織部

位によりその蓄積濃度が異なる [Klun and Robinson 1969, Zúñiga *et al.* 1983]。そこで、様々な植物を用いてその体内 Hx 濃度とアブラムシやアワノメイガなどに対する耐性との関連を調査した結果、Hx 濃度と植物の耐病性の間には正の相関が見いだされた [Argandoña *et al.* 1980, Klun and Robinson 1969]。このため、育種学的手法により植物中の Hx 発現量を上昇させることが可能となれば、植物の抵抗性向上、そして農作物の収量増加につながると思われる。しかし、これまでの多くの試みにも関わらず現在のところはそれほどの成果は報告されていない。今後のさらなる進展のためには Hx 類発現の酵素・遺伝子レベルでの制御機構の解明など、より詳細な情報が必要とされる。

	R1	R2	R3	
	H	H	Glc	DIBOA-Glc
	H	H	H	DIBOA
	MeO	H	Glc	DIMBOA-Glc
	MeO	H	H	DIMBOA
	MeO	MeO	Glc	DIM ₂ BOA-Glc
	MeO	MeO	H	DIM ₂ BOA
	OH	H	H	TRIBOA
	H	H	Glc	HBOA-Glc
	H	H	H	HBQA
	MeO	H	Glc	HMBOA-Glc
	MeO	H	H	HMBOA
	MeO	MeO	Glc	HM ₂ BOA-Glc
	MeO	MeO	H	HM ₂ BOA
	OH	H	Glc	DHBQA-Glc
	MeO	H	Glc	HDMBOA-Glc
	H	H		BOA
	MeO	H		MBOA
	MeO	MeO		M ₂ BOA

これまでに、コムギの発芽直後の時期において DIBOA-Glc や DIMBOA-Glc 等の Hx 配糖体が感染や傷害などとは無関係に非常に高濃度で存在することが見いだされ、従属栄養期における耐病性との関係が示唆されてきた [Ebisui *et al.* 1998, Nakagawa *et al.* 1995]。このような Hx 類の発現機構を明らかにすることは、従属栄養期という植物の生活環のごく限られた時期における防御機構の解明だけでなく、独立栄養期も含めたイネ科植物全般の耐病性の解明にもつながると考えられる。これまでの Hx に関する研究の多くは、独立栄養期のトウモロコシを植物材料としたものがほとんどであり、コムギやライムギ、特にそれらの従属栄養期における研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、従属栄養期イネ科植物における耐病性の発現機構解明の一環として、コムギおよびライムギの Hx 類生合成酵素に関する詳細な知見を得ることを目的とした。そのため、発芽直後の時期においての Hx 類生合成酵素の動態を明らかにし、さらに Hx 発現に最も直接的に関与している 2 つの酵素、HxGlc-β-D-グルコシダーゼと UDP-Glc:Hx グルコシルトランスフェラーゼの精製・性状解析を行った。

第一章 コムギ芽生えにおけるHBOAおよびインドール水酸化酵素の動態と性状解析

1-1. 序論

先にも述べたとおりコムギ・トウモロコシ・ライムギなどのイネ科植物には、病害虫に対する耐病性因子として 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIBOA) や 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) のグルコース配糖体 (HxGlc) が蓄積されている [Niemeyer 1988]。Hx 類の生合成経路はアントラニル酸を初発物質とし、インドールを分岐点としてトリプトファン生合成経路と Hx 生合成経路に分かれると考えられている [Desai *et al.* 1996]。DIBOA はインドールに 4 つの酸素原子が導入されることにより生合成されるが (図 1-1)、これら炭素原子と結合している 4 つの酸素原子がいずれも分子状酸素由来であることから、インドールから DIBOA への反応はチトクローム P-450 酵素によるものであることが示唆されてきた [Glawischnig *et al.* 1997]。さらに、*N*-4-ヒドロキシ基もチトクローム P-450 の働きにより導入されることが示されている [Bailey and Larson 1991; Leighton *et al.* 1994]。近年、トウモロコシの芽生えにおいて高レベルで発現しているチトクローム P-450 遺伝子が Frey らにより cDNA ライブラリーより単離され [Frey *et al.* 1995]、これらの遺伝子がインドールから indolin-2-one, 3-hydroxyindolin-2-one, HBOA を経由した DIBOA 生合成酵素をコードしているということが明らかにされた [Frey *et al.* 1997]。しかし、以上の研究はすべてトウモロコシにおいてのものであり、コムギやライムギなどの他の植物に関する報告は数少ない。

コムギおよびトウモロコシの発芽直後の時期に、傷害などとは無関係に HxGlc およびそのグルコシダーゼが高濃度で発現していることが知られており、この時期における植物の耐病性発現への関与が示唆されている [Nakagawa *et al.* 1995; Ebisui *et al.* 1998]。また、同時期の植物に投与した [^{14}C] アントラニル酸が効率よく Hx 類に取り込まれることから [Nakagawa *et al.* 1995]、このような Hx 類の発現は *de novo* 合成によるものであると考えられる。そこで第一章では、Hx 代謝経路上のインドール以降の水酸化反応 (一酸素原子付加反応) に注目し、その経路上で最初と最後に相当する酵素活性を測定することにより、酵素レベルで Hx 類発現に関する知見を得ることを目的とした。

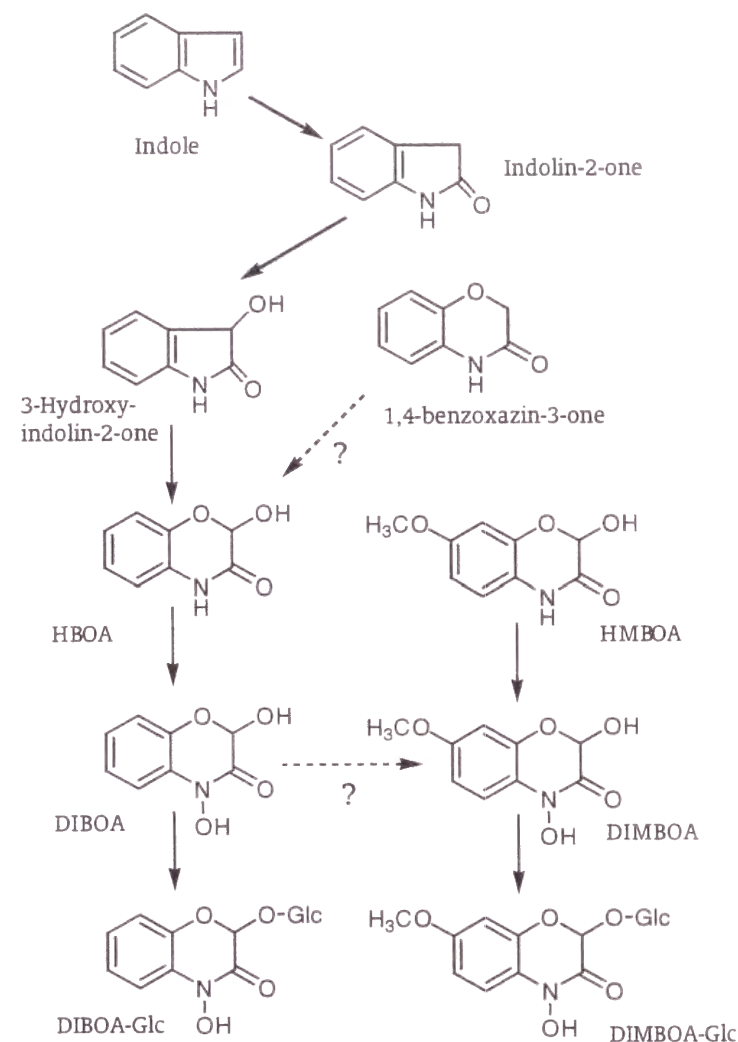


図 1-1. Hx類の代謝経路

1-2. 実験方法

1-2-1. 植物材料および Hx 類の調製

コムギ (*Triticum aestivum* L.) (品種：アサカゼコムギ) の生育は、湿らせたペーパータオルの上に播種後、日長 12 時間、25 °C でインキュベートすることにより行った。

DIBOA およびその配糖体 DIBOA-Glc は播種後 3 日のライムギ (*Secale cereale* L.) (品種：春一番) 茎葉部より単離した。配糖体は、植物体を液体窒素で凍結後、磨砕し、新鮮重の 5 倍量のメタノールで抽出した。その後、抽出物を 12,000 *g* で遠心分離し、得られた上清を減圧濃縮した。さらに濾紙を用いて濾過した後、ヘキサンに対して分液し、得られたメタノール層を減圧濃縮した。その後、50% (v/v) メタノールに溶解し、ODS ゲル (ODS-AM 120-S50; YMC Co., Kyoto, Japan) を加えて攪拌し、疎水性の不純物をゲル担体に吸着させることにより除去した。濾液を 5 – 10 ml まで濃縮し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分取により最終的な精製を行った [カラム, Wakosil II 5C18 HG (20 x 250 mm); 溶出溶媒, 24% (v/v) メタノール / 0.1% (v/v) 酢酸水溶液; 流速, 10 ml/min; カラム温度, 40 °C; 検出, 280 nm]。アグリコンは、精製した配糖体を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中、コムギより調製したグルコシダーゼ粗酵素液により室温で 1 時間加水分解し、配糖体と同条件での HPLC 精製を行うことにより得た。DIMBOA および DIMBOA-Glc の調製は、播種後 3 – 4 日のトウモロコシ (*Zea mays* L.) (品種：スノーデント 108) 茎葉部を材料とし、DIBOA もしくは DIBOA-Glc と同様の方法により行った。2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) および 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA) は Honkanen ら (1960) の方法に従い合成した。また、その配糖体、HBOA-Glc および HMBOA-Glc はそれぞれ DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc を還元することにより得た [Honkanen and Virtanen 1960]。1,4-Benzoxazine-3-one および indolin-2-one は市販のものを使用した (SIGMA)。

1-2-2. ミクロソーム画分の調製

以下の作業はすべて、4 °C で行った。ミクロソーム画分の調製は、おもに Bailey ら (1991) の方法に従って調製した。植物体を新鮮重の 3 倍量の抽出液 (0.3 M スクロース、5 mM DTT、3% (w/v) Polyclar AT、50 mM HEPES、pH 7.5) 中、乳鉢を用いて破碎した。つづいて、懸濁液を 26,000 *g* で 15 分間遠心分離後、その上清をさらに 190,000 *g* で 45 分間遠心分離した。そこで得られた沈殿を先の抽出液に懸濁した後、再度 190,000 *g* で 45 分間遠心分離後、

沈殿を少量の抽出液に再懸濁したものをミクロソーム画分として用いた。

1-2-3. 酵素活性の測定

酵素活性は、200 µg のタンパク質を最終液量 1 ml の反応液 (50 mM Tris-HCl、0.2 mM 基質、0.4 mM NADPH、2 mM DTT、pH 7.5) に添加し、35 °C で適当時間インキュベートすることにより行った。また、インキュベート中は酸素供給のため、攪拌を行った (400 rpm)。1 *N* 塩酸を 100 µl 添加することにより反応を停止した後、反応生成物を 3 ml の酢酸エチルにより抽出した。この抽出液を減圧下で乾固後、500 µl のメタノールに溶解させ、その溶解液中の反応生成物を HPLC を用いて分析した [カラム, Wakosil II 5C18 HG (4.6 x 150 mm); 溶出溶媒, 7.5% (v/v) アセトニトリル / 0.1% (v/v) 酢酸水溶液; 流速, 0.8 ml/min; カラム温度, 40 °C; 検出, 280 nm]。また、生成物の同定には、LC-MS を使用した。タンパク質量はウシ血清アルブミンを標準として用い、Bradford [Bradford 1976] の方法に従い測定した。

1-3. 結果

1-3-1. コムギ芽生えにおける水酸化酵素活性

本研究における植物生育条件下では、使用したコムギは播種後約 16 – 20 時間で発芽を開始した。また、Hx が発芽間もない時期（播種後 36 – 48 時間）に特に茎葉部において高いレベルで発現していることが知られていることから [Nakagawa *et al.* 1995]、ここでは、播種後 48 時間のコムギ茎葉部よりマイクロソーム画分を調製し、Hx 生合成経路に含まれていると考えられる水酸化酵素活性（酸素原子付加反応）を測定した。その結果、HBOA から DIBOA、そしてインドールから indolin-2-one への反応は、基質とマイクロソーム画分を 30 分インキュベートすることにより検出することが出来た。また、pH 5.5 – 9.5 の間での反応の至適 pH を測定したところ、両酵素反応とも pH 7.5 で最大の活性を示した。しかし、7-メトキシ類縁体である HMBOA を基質とした場合には、基質濃度 2 mM で 12 時間反応を行っても、予想しうる反応生成物を検出することはできなかった。

表 1-1. コムギ茎葉部（播種後 48 時間）より調製したマイクロソーム画分の水酸化酵素活性

基質	生成物	酵素活性 (pkat/mg protein)
HBOA	DIBOA	0.47
Indole	Indolin-2-one	0.11
1,4-Benzoxazin-3-one	HBOA	0.021

トウモロコシより調製したマイクロソーム画分を用いた場合、1,4-benzoxazin-3-one を基質として DIBOA が生成することが報告されている [Kumar *et al.* 1994]。しかし、この化合物が実際の植物中における Hx 前駆体であるかは議論の余地が残るところである [Frey *et al.* 1997]。そこで今回は、この 1,4-benzoxazin-3-one を基質とした場合の酵素活性も測定した。その結果、1,4-benzoxazin-3-one より HBOA への活性が検出された。しかし、その活性は他の基質と比べて低いものであり、HBOA を基質とした場合の約 1/20 程度の活性であった（表 1-1）。

HBOA、インドールおよび 1,4-benzoxazin-3-one に対する V_{\max} 値および K_m 値を表 1-2 に示す。これら 3 つの基質の中では、HBOA に対する活性が最も高いものであった。1,4-

Benzoxazin-3-one に対する K_m 値は他の 2 つの基質のおよそ 2 倍程度であり、 V_{\max} 値はインドールのおよそ 1/4 程度であった。

表 1-2. コムギ茎葉部（播種後 48 時間）より調製したマイクロソーム画分のヒドロキシラーゼ活性（基質特異性）

基質	K_m (μ M)	Relative V_{\max} (%)
HBOA	83	100
Indole	90	29
1,4-Benzoxazin-3-one	155	8.2

チトクローム P-450 による水酸化反応には分子状酸素が必要とされ、また、その活性は一酸化炭素により阻害されることが知られている。そこで、次に酵素反応における酸素および一酸化炭素の効果を検討した。反応液に一酸化炭素を吹き込むことにより反応液中の酸素を一酸化炭素で置換したところ、上で検出することのできた酵素反応はすべて完全に阻害された。また、反応液への酸素供給を行わずに反応を行ったところ、酵素活性の著しい低下が見られた（data not shown）。この結果から、以上の水酸化反応はチトクローム P-450 によるものであることが示唆された。

1-3-2. コムギ芽生えにおける P-450 活性の経時変化

コムギ芽生えにおいて Hx 類の植物体内濃度は播種後 36 – 48 時間をピークとして経時的に変化することが知られている [Nakagawa *et al.* 1995]。そこで、同時期における Hx 生合成酵素群の活性変化を測定するため、コムギの茎葉部・根部それぞれよりマイクロソーム画分を調製し、前節において活性を測定した水酸化酵素活性を経時的に測定した。

DIBOA の直前の前駆体である HBOA を基質とした場合の活性は、茎葉部・根部とも播種後 36 時間においてすでにかかなりの活性が認められた。そして、播種後 48 時間に最大となった後（茎葉部: 7.5 pkat/g FW、根部: 0.6 pkat/g FW）次第に減少し、最終的には検出不可能なレベルにまで低下した（図 1-2）。茎葉部での活性は、根部での活性のおよそ 10 倍程度大きかった。インドールに対する活性も、HBOA の場合よりは活性が低いものの同様の経時変化を示し、播種後 48 時間で最大となった（図 1-2c）。1,4-Benzoxazin-3-one に対する活性

もまた、HBOA やインドールに対する活性と同調して経時的に変化していた。しかし、その活性は HBOA やインドールに比べ非常に低いものであった（最大値で 0.19 pkat/g FW）。

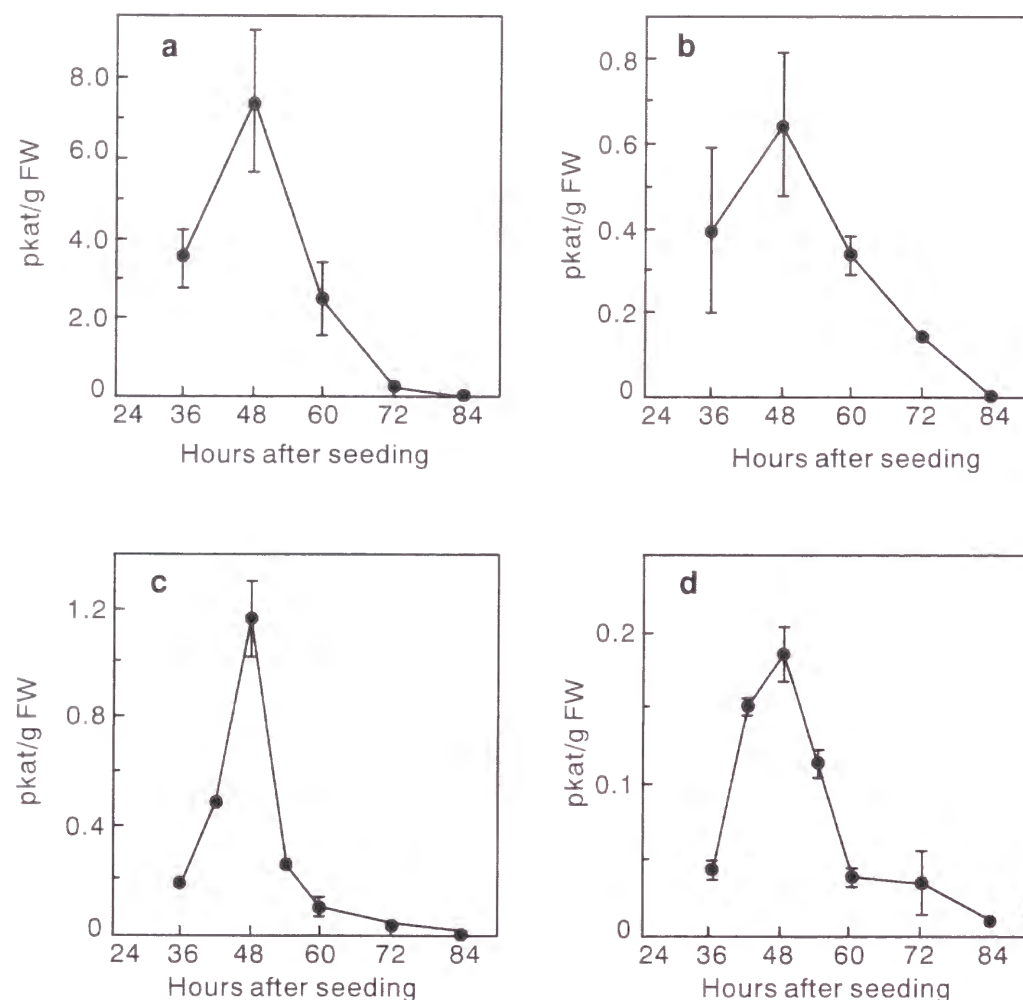


図 1-2. コムギ芽生えより調製したミクロソーム画分における水酸化酵素活性の経時変化

a; 茎葉部における HBOA に対する活性。b; 根部における HBOA に対する活性。c; 茎葉部におけるインドールに対する活性。d; 茎葉部における 1,4-benzoxazin-3-one に対する活性。

1-4. 考察

これまでも Hx 生合成に関与する水酸化酵素の報告はあるが、それらはすべてトウモロコシを用いて行ったものである。また、Leighton らは、ミクロソーム画分の HBOA-*N*-水酸化酵素活性はトウモロコシのみで観察され、コムギおよびライムギではその活性は検出されなかったと報告している [Leighton *et al.* 1994]。しかし、本研究においては、コムギ芽生えの茎葉部および根部より調製したミクロソーム画分の両方において、*N*-水酸化酵素活性を検出することができた。今回使用した植物の生育時期は Leighton らのものとはほぼ同時期（播種後 2-4 日）であるため、今回異なった結果が得られた原因としては、抽出条件や反応条件の違いなどが考え得る。しかし、現段階ではそれに対する明確な回答は得られていない。

N-水酸化酵素活性の測定において、HMBOA を基質とした場合は反応時間を延長しても全く酵素活性を検出することができなかった。このことから Hx 生合成経路における DIMBOA の前駆体は HMBOA ではないということが示唆された。そのため、*N*-ヒドロキシ基の導入は 7-メトキシ基の導入に先立って行われると推察されるが、DIBOA-DIMBOA 間の酵素活性については未だ報告はされていない。

また、本研究において、*N*-水酸化酵素活性と併せてインドール水酸化酵素活性も測定することができた。この酵素活性については、トウモロコシより単離したチトクローム P-450 cDNA を酵母において発現させたものがあるのみである [Frey *et al.* 1997]。しかし、今回インタクトな植物より調製した酵素液においてもこの活性が測定されたことから、実際の植物体内においてもこの酵素が機能していることが示唆された。

Kumar らは、トウモロコシ由来ミクロソーム画分を用い、1,4-benzoxazin-3-one から DIBOA への水酸化酵素活性を測定し、この化合物が Hx の前駆体であるとした [Kumar *et al.* 1994]。また、コムギを材料として用いた本研究においても同様の酵素活性を検出することができた。しかし、最近トウモロコシを用いた研究において、この反応は Hx 生合成経路上のチトクローム P-450 酵素、BX3 による副反応であることが示され [Glawischnig *et al.* 1999]、植物体内における実際の前駆体（HBOA の前駆体）は 3-hydroxy-indolin-2-one であることが明らかにされている [Frey *et al.* 1997; Glawischnig *et al.* 1999]。

Hx 生合成における複数の水酸化反応のうち、最初と最後に位置すると考えられる indole-水酸化酵素活性および HBOA-*N*-水酸化酵素活性が、茎葉部・根部の両方において播種後 48 時間で最大となり、その後植物が独立栄養期に移行していくに従って減少していった。こ

の酵素活性の経時変化は、同時期の Hx 類の経時変化のパターンとよく一致するものである [Nakagawa *et al.*]. このことから、コムギ芽生えにおける Hx 類の一過的な発現は、インドール以降の Hx 生合成経路全体が活性化していることに起因している。Hx 生合成経路上のチトクローム P-450 酵素やインドール合成酵素をコードする mRNA が、トウモロコシにおける発芽直後の時期に高いレベルで発現していることが知られている [Frey *et al.* 1995; Melanson *et al.* 1997]。本研究で得られた結果は、これらトウモロコシでの結果と一致するものであり、トウモロコシおよびコムギにおける Hx 発現調節機構の類似性を示唆するものと考えられる。

第二章 コムギ芽生えにおける UDP-Glc:Hx グルコシルトランスフェラーゼの精製と性状解析

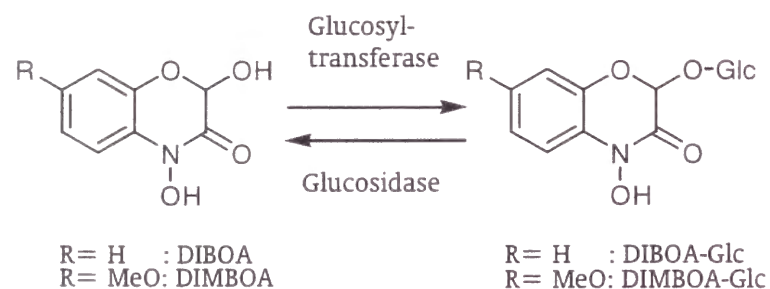
2-1. 序論

動物・植物は、その体内に様々な種類の配糖体を持っている。配糖体は一般に、糖のアノメリック水酸基とアルコール・フェノール・カルボン酸がグリコシド結合により結合した化合物であり、アノマー炭素が結合している原子により *O*-グリコシド・*N*-グリコシド・*S*-グリコシド・*C*-グリコシド等に分類される。*N*-グリコシドは広く動物界に存在し、糖ヌクレオチドや糖蛋白質など重要な生理的役割を果たしている。一方で *O*-グリコシドは主に植物において様々なかたちで広く見られ、糖と脂肪族化合物・芳香族化合物・ステロイド・アルカロイドあるいは多糖が結合した形で存在する。

植物体内には、オーキシン・ジベレリン・サイトカイニンなどの植物ホルモンやフラボノイド・シアン含有化合物・環状ヒドロキシサリシン (Hx) など、非常に多岐にわたる低分子生理活性化合物がグルコース配糖体として存在する。多くの場合、これら配糖体は活性本体であるアグリコンの貯蔵形態として機能し、アグリコン-配糖体間の反応 (糖の転移および加水分解) はこれらの化合物の生理活性発現や化学的安定性に大きな影響を及ぼす。このような配糖体生合成における糖転移反応はグルコシルトランスフェラーゼの働きによるもので、この酵素は糖ヌクレオチドなどの糖供与体 (特に UDP-Glc) からアグリコンへの糖の転移を触媒する。グルコシルトランスフェラーゼは、一般的にグルコシダーゼなどと比べて基質特異性が高いとされているが、例えばアントシアニン生合成に関わるグルコシルトランスフェラーゼなど広い特異性を示すものもある [Saleh *et al.* 1976a and 1976b; Kamsteeg *et al.* 1978a and 1978b; Kho *et al.* 1978; Jonsson *et al.* 1984; Teusch *et al.* 1986]。

コムギ・ライムギ・トウモロコシなどのイネ科植物に含まれる耐病性因子 Hx は、通常植物体内では不活性な 2-*O*-β-グルコシド (HxGlc) として存在しており [Niemeyer 1988]、これら配糖体は UDP-Glc:Hx グルコシルトランスフェラーゼにより生合成される。コムギやトウモロコシの発芽直後の時期においてこれら HxGlc は一過的に高濃度で発現しており、この時期における植物耐病性発現への寄与が示唆されているが [Nakagawa *et al.* 1995]、第一章において、Hx 類の生合成経路上にある複数の水酸化酵素 (チトクローム P-450) が同時期に活性化されていることが示された。そこで、この章においては、HxGlc 生合成経路の最終反応を

つかさどり、Hx 活性の発現調節に関与する酵素、UDP-Glc:Hx グルコシルトランスフェラーゼのコムギ芽生えにおける活性変化について検討することにした。また、このグルコシルトランスフェラーゼについては、これまでにトウモロコシとライムギについては部分精製酵素を用いた性状解析が報告されているが、コムギについては粗抽出物での活性が報告されているのみである [Bailey and Larson 1989; Leighton *et al.* 1994]。そこで、活性の経時変化測定と併せてグルコシルトランスフェラーゼの精製を試み、その性状解析および他植物における酵素との比較を行った。



2-1. 実験方法

2-2-1. 植物材料および Hx 類の調製

コムギ (*Triticum aestivum* L.) (品種：アサカゼコムギ) は、第一章 (1-2-1 節) で述べたのと同様の方法により播種し、生育させた。

DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc は、それぞれ播種後 3 日目のライムギ (*Secale cereale* L.) およびトウモロコシ (*Zea mays* L.) の茎葉部より、第一章 (1-2-1 節) と同様の方法を用いて抽出、精製した。また、DIBOA および DIMBOA はそれらの配糖体をグルコシダーゼ (粗酵素液) により加水分解した後、HPLC で精製することにより得た (第一章参照)。

2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) および 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA) は Honkanen ら [Honkanen and Virtanen 1960] の方法に従い合成し、HBOA-Glc および HMBOA-Glc はそれぞれ DIBOA-Glc、DIMBOA-Glc を還元することにより調製した [Honkanen and Virtanen 1960]。

2-2-2. コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼの経時変化測定

播種後一定時間経過したコムギの茎葉部・根部をそれぞれ切り取り、秤量した後、液体窒素を用いて凍結、磨砕した。続いてこれに抽出液 (50 mM Tris-HCl, 4 mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.5) を添加して懸濁し、懸濁液を 12,000 g で 15 分間遠心分離した。ここで得られた上清を microcon-10 を用いて脱塩後 (内在性基質の除去)、得られた溶液を粗酵素液として用いた。また、種子中における酵素の抽出は、種子を長軸に垂直な面で二分し、胚を含む部分と含まない部分 (胚乳側) それぞれについて上と同様の方法で行った。

酵素活性の測定は、反応液 (50 mM Tris-HCl, 4 mM 2-メルカプトエタノール, pH 7.5) に 0.5 mM UDP-Glc, 0.2 mM 基質 (DIBOA または DIMBOA) および適当量の粗酵素液を添加し、35 °C で適当時間インキュベートすることにより行った。反応停止は反応液の 1/10 量の 1 N 塩酸を添加することにより行った。生成した配糖体量は HPLC により定量した [(DIBOA の定量) カラム, Wakosil 5C18HG (4.6x150 mm); 溶出溶媒, A 液: 0.1% (v/v) 酢酸水溶液、B 液: メタノール; 溶出条件, 0 – 10 min: 3 – 10% B 液、10 – 25 min: 10 – 25% B 液; 流速, 1.0 ml/min; カラム温度, 40 °C; 検出, 280 nm ; (DIMBOA の定量) カラム, Wakosil 5C18HG (4.6x150 mm); 溶出溶媒, A 液: 0.1% (v/v) 酢酸水溶液、B 液: メタノール; 溶出条件, 0 – 4 min: 10% B 液、4 – 25 min: 10 – 20% B 液、25 – 30 min: 20% B 液; 流速, 1.0 ml/min; カラ

ム温度, 40 °C; 検出, 280 nm]。

2-2-3. グルコシルトランスフェラーゼの精製

以下の操作はすべて 4 °Cで行った。コムギ播種後 48 時間目の茎葉部を液体窒素で凍結後磨碎し、2-2-2 節と同様の抽出液（新鮮中の 5 倍量）を用いて粗酵素液を調製した。この粗酵素液に硫酸アンモニウムを 45% 飽和になるまで添加した後、20,000 *g* で 30 分間遠心分離し、得られた上清にさらに硫酸アンモニウムを 60% 飽和になるまで添加した。その後、20,000 *g* で 30 分間遠心分離を行い、得られた沈殿を少量の抽出液に懸濁した。この懸濁液を PD-10 カラムを用いて脱塩後、同じ緩衝液であらかじめ平衡化した Blue-Sepharose カラム（約 20 ml）に添加した。カラムに保持されなかったタンパク質を同じ緩衝液を用いて洗浄後、溶出液（10 mM UDP-Glc、50 mM Tris-HCl、4 mM 2-メルカプトエタノール、pH 7.5）を用いて目的タンパク質を溶出した。この溶出溶液を限外濾過により濃縮した後、Superdex 200 HR 10/30 カラム（Pharmacia）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した（溶出溶媒: 50 mM Tris-HCl、4 mM 2-メルカプトエタノール、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.5; 流速: 0.5 ml/min）。さらにここで得られた活性画分を、50 mM Tris-HCl、4 mM 2-メルカプトエタノール（pH 8.0）であらかじめ平衡化した Mono Q HR 5/5 カラム（Pharmacia）に添加し、110 – 260 mM の塩化ナトリウム直線勾配（溶出液量: 50 ml）によりタンパク質を溶出した。

各精製段階における活性測定には 200 mM DIMBOA を基質として用いた。また、タンパク質定量は、Bradford（1976）の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準として行った。また、ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分子量測定には以下のタンパク質を標準として用いた；フェリチン（440 kDa）、ヒト IgG（160 kDa）、トランスフェリン（81 kDa）、オブアルブミン（43 kDa）、ミオグロビン（17.6 kDa）。

2-2-4. 酵素活性の測定

グルコシルトランスフェラーゼの活性測定は、0.5 mM UDP-Glc および 0.2 mM 基質（DIBOA または DIMBOA）を含む反応液（50 mM Tris-HCl、4 mM 2-メルカプトエタノール、pH 7.5）に適当量の粗酵素液を添加し、35 °Cで適当時間インキュベートすることにより行った。反応停止および生成物の定量は 2-2-2 節と同様の方法により行った。また、反応の至適 pH は、pH 5.2 – 7.4 はリン酸カリウム緩衝液、7.4 – 9.2 は Tris-HCl 緩衝液、9.2 – 11 はグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を用いて測定した。

2-2-5. 電気泳動

各精製段階における活性フラクション中のタンパク質は、Laemmli（1970）の方法に従い、変性条件下におけるポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により分析した。

2-3. 結果

2-3-1. コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼ活性の経時変化

コムギ中の HxGlc 濃度が、吸水開始後から急速に増大するという過去の報告に基づき [Nakagawa *et al.* 1995]、コムギ吸水種子中および発芽後の茎葉部、根部におけるグルコシルトランスフェラーゼ活性を経時的に測定した。なお、本研究におけるコムギの生育条件下では、播種後（吸水開始後）約 16 – 20 時間程度で発芽を始めた。

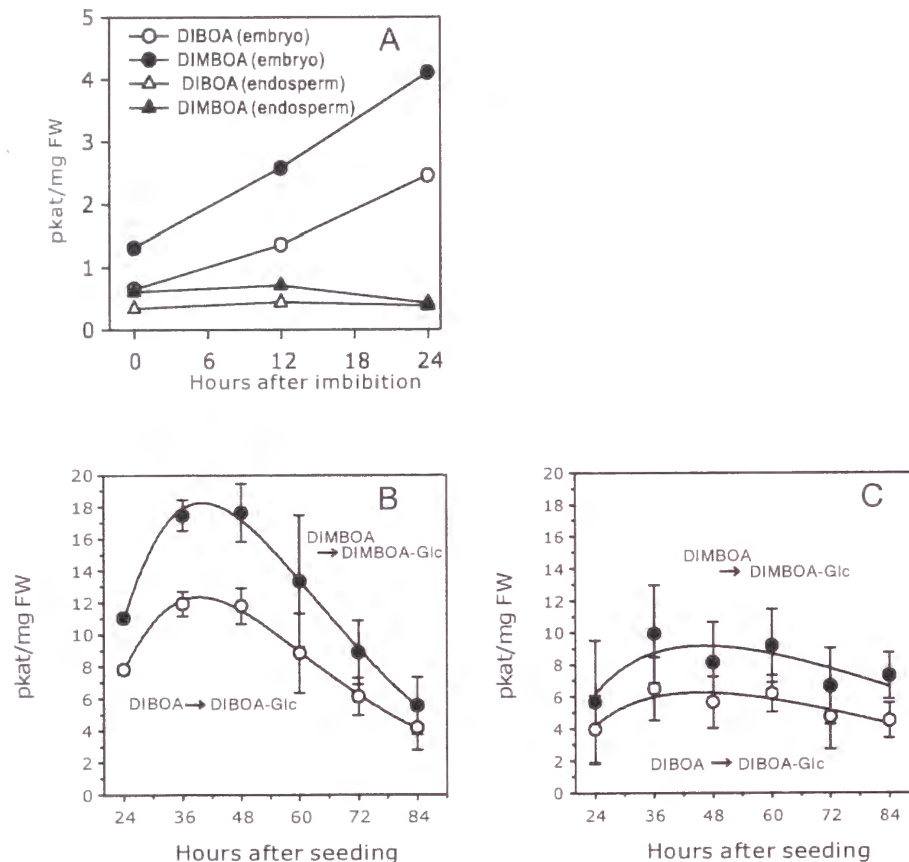


図 2-1. 吸水種子 (A) および芽生えにおける (B, C) におけるグルコシルトランスフェラーゼ活性の変化

A: 吸水種子中の活性。●, DIMBOA グルコシルトランスフェラーゼ (胚側)、○, DIBOA グルコシルトランスフェラーゼ (胚側)、▲, DIMBOA グルコシルトランスフェラーゼ (胚乳側)、△, DIBOA グルコシルトランスフェラーゼ (胚乳側)。B, C: 茎葉部 (B) および根部 (C) における活性。●, DIMBOA グルコシルトランスフェラーゼ、○, DIBOA グルコシルトランスフェラーゼ

図 2-1-A に示すように、吸水前の乾燥種子中においても、わずかながらではあるが活性が認められた。そして、吸水開始 12 時間後には、胚側部分における活性が約 2 倍に、そして 24 時間後にはおよそ 3 – 4 倍程度に上昇した。またこのとき、DIBOA と DIMBOA の両基質に対する活性は同調して増加していた。一方で、胚乳部分（胚を含まない側）における酵素活性は、両基質に対して吸水開始後 24 時間までの間に変化は認められなかった。

発芽後の茎葉部・根部それぞれにおける活性の変化を図 2-1-B および 2-1-C に示す。DIBOA および DIMBOA に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性は発芽以降も上昇し、茎葉部・根部の両方において播種後 36 – 48 時間で最大となった（茎葉部；DIBOA: 12.3 pkat/mg FW, DIMBOA: 17.5 pkat/mg FW、根部；DIBOA: 6.5 pkat/mg FW, DIMBOA: 9.5 pkat/mg FW）。その後、茎葉部では独立栄養期に移行するに従って急速に活性が低下し、播種後 168 時間では最大値のおよそ 1/10 程度となった。一方で、根部においては緩やかに活性が低下していった。ここにおいても先と同じように、DIBOA と DIMBOA の両基質に対する活性は完全に平行して変化していた。

2-3-2. コムギ芽生えからのグルコシルトランスフェラーゼの精製

前節において、UDPG:Hx グルコシルトランスフェラーゼ活性が、播種後 36 – 48 時間で最大となることが明らかになった。そこで、播種後 48 時間のコムギ茎葉部よりグルコシルトランスフェラーゼの精製を試みた。

粗酵素液を硫酸アンモニウムを用いた塩析により分画したところ、ほぼすべての活性は 45 – 60% 飽和画分に認められた。次に、この画分を緩衝液に再懸濁後脱塩し、Blue-Sepharose を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供した。グルコシルトランスフェラーゼの酵素反応における基質（糖供与体）である UDP-Glc によりカラムからタンパク質を溶出した結果、比活性は 46 倍程度上昇した。その後、Superdex 200 によるゲル濾過クロマトグラフィーにおいては、溶出液量 13.5 ml で活性が最大となり、本酵素の分子量はおよそ 40 kDa と推定された（図 2-2）。続いて、ここで得られた活性画分を Mono Q を用いた強陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、二つの明瞭な活性ピークが検出された（図 2-3）。主要ピーク（ピーク 2）各フラクション中のポリペプチド構成を SDS-PAGE により分析したところ、分子量 49 および 47 kDa のバンドのみが観察され、両バンドの強度変化が酵素活性変化と一致していた（図 2-4）。また、もう一つの活性ピーク（ピーク 1）についても SDS-PAGE により分析したところ、分子量 47 kDa のバンドを主要バンドとして含むことが明らかになった（図 2-5）。以

上の結果より、コムギのグルコシルトランスフェラーゼは分子量 49 および（もしくは）47 kDa のモノマーであり、2 つ以上のアイソザイムが存在することが示された。

ここまでの精製過程で、Mono Q クロマトグラフィーにおけるピーク 2 については、およそ 1500 倍の精製が達成された（表 2-1）。しかし、ピーク 1 についてはタンパク質量が微量であったため、比活性を測定することができなかった。

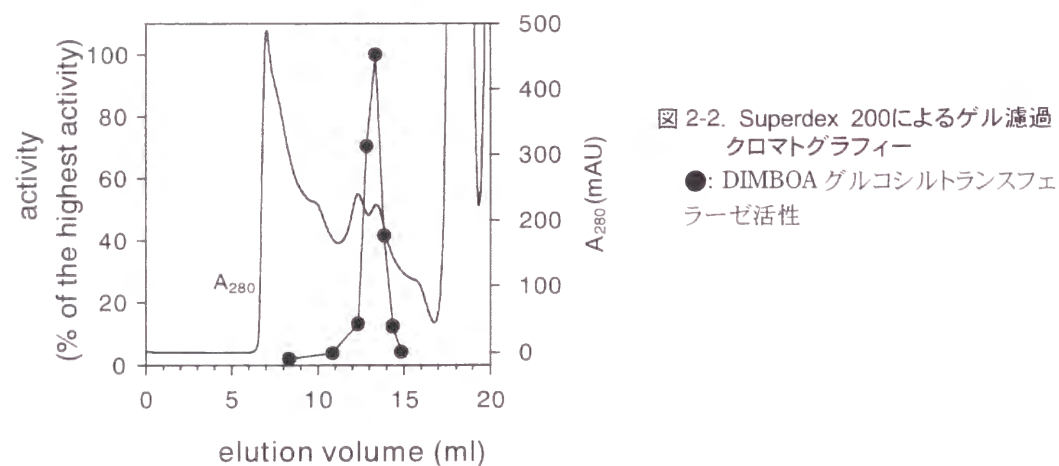


図 2-2. Superdex 200によるゲル濾過クロマトグラフィー
●: DIMBOA グルコシルトランスフェラーゼ活性

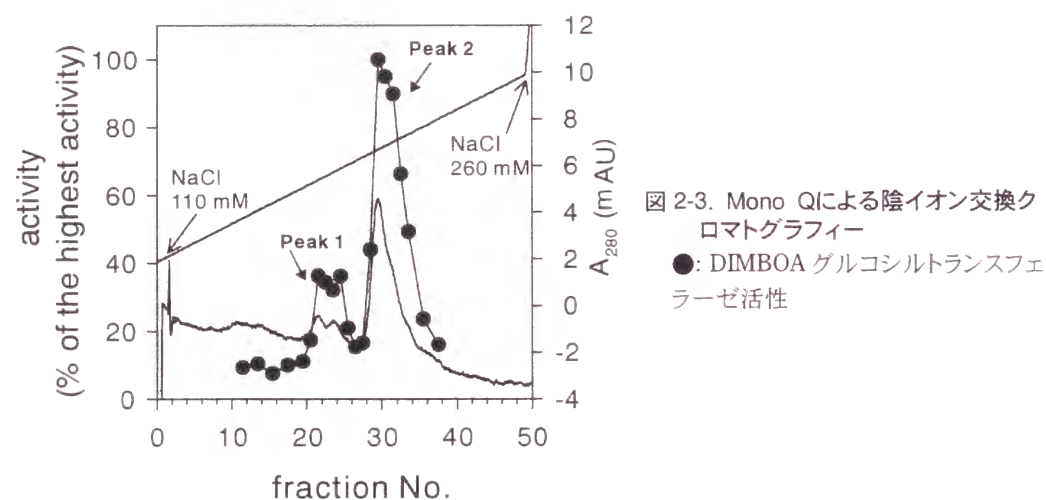


図 2-3. Mono Q による陰イオン交換クロマトグラフィー
●: DIMBOA グルコシルトランスフェラーゼ活性

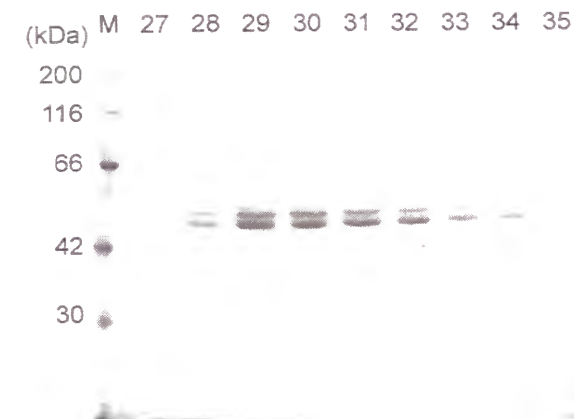


図 2-4. 陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q) における各活性フラクションの SDS-APGE
ゲル上の数字は Mono Q におけるフラクション番号。M: マーカータンパク質

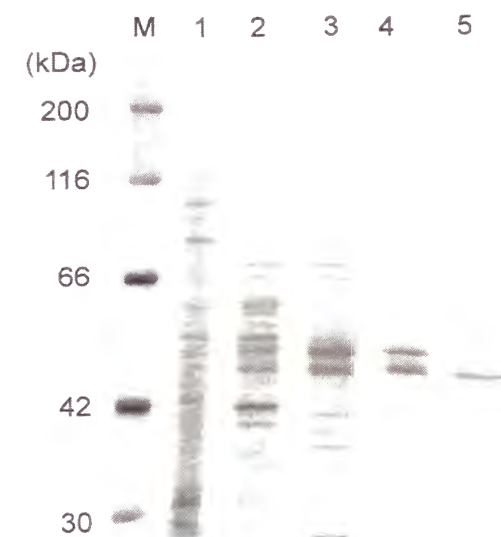


図 2-5. 各精製段階における活性フラクションの SDS-PAGE
M: マーカータンパク質、1: 粗酵素液、2: Blue Sepharose、3: Superdex 200、4: Mono Q (ピーク 2)、5: Mono Q (ピーク 1)

2-3-3. グルコシルトランスフェラーゼの特性

前節（2-3-2 節）において部分精製され、コムギ芽生えにおけるグルコシルトランスフェラーゼ（Mono Q クロマトグラフィーでのピーク 2）について性状解析を行った。

表 2-1. グルコシルトランスフェラーゼの精製

	Specific activity (nkat/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
粗酵素液	0.7	100	1.0
Blue Sepharose	30.8	34.1	46.7
Superdex 200	99.6	20.4	151
Mono Q	982.1	4.7	1488

表 2-2. グルコシルトランスフェラーゼの基質特異性

	V_{\max} (nkat/mg protein)	K_m (μ M)
DIBOA	446	41.3
DIMBOA	1424	40.6
HBOA	n.d.	n.d.
HMBOA	n.d.	n.d.
Esculetin	n.d.	n.d.

n.d.: Not detected

反応の至適 pH を測定したところ、pH 7.5 – 7.7 の間で最大値となった。そこで以下の測定には pH 7.5 の反応液を用いた。糖受容体として DIBOA 用いた場合の K_m 値および V_{\max} 値はそれぞれ、41.3 μ M、446 nkat/mg protein であった（表 2-2）。また、DIMBOA に対する K_m 値および V_{\max} 値はそれぞれ、40.6 μ M、1424 nkat/mg protein であった。また、糖供与体の UDP-Glc に対する K_m 値は 40.0 μ M であった。一方で、Hx ではなくラクタムである HBOA および HMBOA を糖受容体とした場合は、反応液中の酵素添加量を増やし反応時間を延長した場合でも、酵素活性を検出することができなかった。Mono Q クロマトグラフィーにおけるピーク 1 に対しても DIBOA および DIMBOA に対する K_m 値を求めた結果、それぞれ 64.6 μ M および 37 μ M であった。ピーク 1 に関してはタンパク質濃度を測定することができなかったため、その V_{\max} 値を算出することはできなかったが、DIMBOA に対する活性は DIBOA に対する活性のおよそ 2 – 3 倍程度であった（data not shown）。

次に、EDTA、2-メルカプトエタノール、金属陽イオンの効果を表 2-3 に示す。2価イオンのキレーターである EDTA を 5 mM 添加した場合でも、酵素活性に変化は認められなかつ

表 2-3. 2-メルカプトエタノール、EDTA および金属陽イオンの効果

	Relative activity (%)
Control	100
EDTA (0.5 mM)	101
2-Mercaptoethanol (4 mM)	140
Cu ²⁺ (5 mM)	0
Mn ²⁺ (0.5 mM)	41.4
Ca ²⁺ (0.5 mM)	101
Mg ²⁺ (0.5 mM)	102

た。一方で、還元試薬である 2-メルカプトエタノールは、酵素活性をおよそ 40% 増大させた。また、金属陽イオンの中では、Cu²⁺ が酵素活性を完全に阻害し、Mn²⁺ も約 60% 阻害した。その他の Ca²⁺ および Mg²⁺ は全く活性に変化を与えなかった。ここでの 2-メルカプトエタノールおよび Cu²⁺ の効果は、部分精製したトウモロコシグルコシルトランスフェラーゼに対する過去の報告 [Bailey and Larson 1989] と一致するものであった。

2-4. 考察

コムギの耐病性因子である Hx 類の濃度が発芽後急速に上昇し、その後独立栄養期に移行するに従って減少していくことが知られている [Nakagawa *et al.* 1995]。また前章において、これらの生合成経路上流に位置する水酸化酵素（チトクローム P-450）が、Hx 類の消長と同調して増減していることを明らかにした。この第 2 章においては、これら水酸化酵素のさらに下流に位置し HxGlc 生合成の制御に最も直接的に関わるグルコシルトランスフェラーゼの同時期における活性変化を測定した。その結果、この酵素活性も同様の消長パターンを示すことが明らかになり、この時期の Hx 類発現の調節にグルコシルトランスフェラーゼが関与していることが示唆された。さらにこの結果は、発芽直後の時期における Hx 生合成経路全体の活性化、という前章での考察を支持するものである。

コムギに含まれる Hx 類は主に DIMBOA-Glc であるが、特に発芽直後の時期においては DIBOA-Glc も比較的高い濃度で発現している [Nakagawa *et al.* 1995]。また、DIBOA-Glc と DIMBOA-Glc の発現時期には若干の相違が認められている。このことから、DIBOA と DIMBOA に対してそれぞれに特異的な 2 つの酵素が存在するのではないかと考え得るが、両基質に対するグルコシルトランスフェラーゼ活性の経時変化は茎葉部・根部ともに完全に平行したものであった。このことから、この時期に発現している主な Hx グルコシルトランスフェラーゼはただ一つであるということが示唆された。

酵素精製における強陰イオン交換クロマトグラフィー（Mono Q）において、二つの DIMBOA-グルコシルトランスフェラーゼ活性が検出された（図 2-3、ピーク 1 および 2）。また、ピーク 1 に関してはさらに 2 つピークが近接して構成されているようにも見える。この結果から、コムギには少なくとも 2 つのグルコシルトランスフェラーゼアイソザイムが存在することが示唆された。Bailey ら [Bailey and Larson 1989] はトウモロコシからの酵素精製において、同じく陰イオン交換クロマトグラフィーによって 2 つの DIMBOA-グルコシルトランスフェラーゼ活性が検出されることを報告している。そして、より高濃度の塩により溶出されたアイソザイムの DIBOA、DIMBOA に対する K_m 値にはそれほど差がないものの、低濃度で溶出されるアイソザイムは DIMBOA のみに高い親和性を示すことを明らかにした。しかし、今回得られたコムギグルコシルトランスフェラーゼの場合は、DIBOA および DIMBOA の両基質に対する K_m 値に関して 2 つのピーク間では有意な差は見られなかった。このことから、コムギにおけるアイソザイムはトウモロコシにおいて報告されている 2 種のアイソザイムに相当するものではない

と考えられた。

今回用いた精製過程により、最終的に比活性が約 1500 倍程度になった（Mono Q クロマトグラフィーにおけるピーク 2）。しかし、SDS-PAGE による分析では 49 および 47 kDa の 2 つのポリペプチドの確認され、また、この 2 つのペプチドの Mono Q カラムからの溶出パターンは全く同じであったため、このどちらがグルコシルトランスフェラーゼに相当するのかは明らかにならなかった。これまでに、アブラナ科より単離された UDP-Glc:シナピン酸グルコシルトランスフェラーゼが、糖供与体のヌクレオチド部分に高い特異性を示すことが報告されている [Wang and Ellis 1998]。そこで、これらの 2 つのペプチドをクロマトグラフィーにより分離するために、UDP-hexanolamine をアフィニティークロマトグラフィーの担体として精製を試みたものの、この担体は本酵素を吸着することができなかった。また、ヒドロキシアパタイトも同様であり、本研究においてはこれらのペプチドをそれぞれ分離することは不可能であった。コムギは、A,B,D の 3 つのゲノムより構成される 6 倍体植物であるため、同様の生理的活性を持つ酵素を複数持っている可能性も否定することはできない。このため、本章で示された 49 および 47 kDa のポリペプチドの両方がグルコシルトランスフェラーゼであるとも考え得る。

これまでに Hx をその体内に蓄積する植物については、トウモロコシおよびライムギより Hx-グルコシルトランスフェラーゼが部分精製されている [Bailey and Larson 1989; Leighton *et al.* 1994]。本章で精製を行ったコムギグルコシルトランスフェラーゼ（ピーク 2）の DIBOA、DIMBOA に対する K_m 値はほぼ同程度であり、 V_{max} 値は DIMBOA が DIBOA のおよそ 3-4 倍程度であった。また、ピーク 1 に関しても K_m 値は同様の結果であった。この結果は、これまでに報告されているトウモロコシ・ライムギの酵素と同様のものであり、そこで見られる若干の相違は、酵素の精製状態や反応条件の違いなどにより説明しうる範囲のものである。また、今回得られた結果は、過去に報告のあるコムギ粗酵素液中のグルコシルトランスフェラーゼ活性と同様の傾向である [Leighton *et al.* 1995]。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーによるトウモロコシおよびライムギグルコシルトランスフェラーゼの分子量は、それぞれ 50 および 43 kDa である。これは、本研究で得られた分子量測定とほぼ同一といえる。また、 Cu^{2+} や 2-メルカプトエタノールの酵素活性に及ぼす効果は、Bailey ら [Bailey and Larson 1989] の示したトウモロコシ由来グルコシルトランスフェラーゼの結果と同じものである。これらの結果に加え、本章ではコムギグルコシルトランスフェラーゼの分子量はゲル濾過クロマトグラフィーにより 40 kDa、SDS-PAGE により 49 または（および）47 kDa であったことから、この酵素は単一のサブユニットからなるモノマーとして存在することが明らかになった。

これまでの結果より、コムギ・トウモロコシ・ライムギに存在する Hx-グルコシルトランスフェラーゼの性質は、多少の違いはあるもののほぼ同様のものであることが示された。トウモロコシおよびコムギは Hx として DIMBOA-Glc を主に蓄積し、ライムギは DIBOA-Glc を蓄積する [Niemeyer 1988]。しかし、グルコシルトランスフェラーゼは、これら 3 種の植物すべてで類似の基質特異性を示すことが明らかになった。この結果は、グルコシルトランスフェラーゼと同じく Hx 発現に直接的に関与するグルコシダーゼとは異なるものである。このことは、これら植物における Hx 発現機構の進化を酵素レベルで考える上で非常に興味深い結果といえる。

第三章 コムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼの精製と性状解析

3-1. 序論

β -グルコシダーゼ (EC 3.2.1.21) は、動植物をはじめカビやバクテリア等まで幅広く生物に存在する酵素である [Woodward and Wiseman 1982]。この酵素はアリール-グルコースまたはアルキル-グルコースといったグルコース配糖体を基質とし [Reese 1977]、その O-グルコシド結合の加水分解反応を触媒する。本酵素の生理的役割としては様々なものをあげることができるが、植物におけるその役割の一つとしては耐病性への関与があり、シアン含有化合物・環状ヒドロキサム酸 (Hx)・ステロイド・イソフラボノイド等のグルコース配糖体を加水分解することにより病害虫に対する抵抗性化合物を遊離させる [Hösel and Barz 1975; Conn 1981; Niemeyer 1988; Nisius 1988; Cuevas 1992]。グルコシダーゼとその基質であるグルコース配糖体は、細胞内においてそれぞれ異なる部位に保存されていると考えられており、例えばシロツメクサやカッサバでは細胞壁 [Kakes 1985; Mkpogon *et al.* 1990; Hughes *et al.* 1992]、トウモロコシ・モロコシ・エンバクではプラスチド [Thayer and Conn 1981; Nisius 1988; Esen and Stetler 1993; Cicek and Esen 1998] 等に酵素が存在するとされている。そして傷害や感染などにより細胞が物理的に破壊されることで酵素と基質が接触し、グルコースと活性本体であるアグリコンが遊離する。

DIBOA や DIMBOA といった Hx 類はコムギ・トウモロコシ・ライムギなどのイネ科植物に見られる耐病性因子であり、抗カビ・抗バクテリア活性を示す [Niemeyer 1988]。これら Hx 類のグルコース配糖体 (DIBOA-Glc と DIMBOA-Glc; HxGlc) は、コムギやトウモロコシの発芽直後の時期に一過的に最も多量に発現している二次代謝産物である [Nakagawa *et al.* 1995; Ebisui *et al.* 1998]。そして、前章までにおいて、このような Hx 類の消長は Hx 生合成経路全体の活性化によるものであることが示された。

Hx 類の生合成には多くの酵素が関わっているが、その中でも β -グルコシダーゼは活性本体である Hx 類アグリコンの発現に最も直接的に関与する酵素である。つまり、従属栄養期におけるコムギ耐病性の発現制御に最も深く関与している酵素であるといえ、その性状を明らかにすることは非常に重要な意味を持つといえる。これまで、Hx 類を体内に蓄積する植物のグルコシダーゼに関しては、トウモロコシの酵素が最もよく研究されている [Esen 1992; Babcock and Esen 1994]。しかし、コムギを含むその他の植物に関しては全く情報がない。

そこで、この第 3 章ではコムギの芽生えに発現しているベンゾキサジノン配糖体グルコシダーゼの精製を行い、その性状解析を行った。また、コムギ品種・種間でのアイソザイムの多形性についても検討した。

3-2. 実験方法

3-2-1. Hx 類の調製

DIBOA およびその配糖体 DIBOA-Glc は播種後 3 日のライムギ (*Secale cereale* L.) (品種：春一番) 茎葉部より単離した。配糖体は、植物体を液体窒素で凍結後、磨砕し、新鮮重の 5 倍量のメタノールで抽出した。その後、抽出物を 12,000 g で遠心分離し、得られた上清を減圧濃縮した。さらに濾紙を用いて濾過後、ヘキサンに対して分液し、得られたメタノール層を減圧濃縮した。その後、50% (v/v) メタノールに溶解し、ODS ゲル (ODS-AM 120-S50; YMC Co., Kyoto, Japan) を加えて攪拌することにより、疎水性の不純物をゲル担体に吸着させて除去した。この溶液を 5 – 10 ml まで濃縮したのち、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分取により精製を行った [カラム, Wakosil II 5C18 HG (20 x 250 mm); 溶出溶媒, 24% (v/v) メタノール / 0.1% (v/v) 酢酸水溶液; 流速, 10 ml/min]。アグリコンは、精製した配糖体を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 中でコムギグルコシダーゼの粗酵素液により室温・1 時間加水分解し、配糖体と同条件での HPLC 精製を行うことにより得た。DIMBOA および DIMBOA-Glc の調製は、播種後 3 – 4 日のトウモロコシ (*Zea mays* L.) (品種：スノーデント 108) 茎葉部を材料とし、DIBOA もしくは DIBOA-Glc と同様の方法により行った。2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) および 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA) は Honkanen (1960) らの方法に従い合成した。また、その配糖体、HBOA-Glc および HMBOA-Glc はそれぞれ DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc を還元することにより得た [Honkanen and Virtanen 1960]。

3-2-2. 植物材料

プラスチック製バットに蒸留水で湿らせたペーパータオルを敷き、その上にコムギ (*Triticum aestivum* L.) (品種：アサカゼコムギ) 種子を播種し、日長 12 時間、25 °C で一定時間インキュベートした。

3-2-3. β -グルコシダーゼの精製

以下のすべての作業は 4 °C で行った。コムギからのグルコシダーゼの精製は主に Esen (1992) の方法に従い行った。播種後 48 時間のコムギ茎葉部、およそ 3 g を液体窒素中で凍結、磨砕し、新鮮重の 5 倍量の抽出液 (50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0) に懸濁し

た。懸濁液を 15,000 *g* で 20 分間遠心分離後、得られた上清を限外濾過することにより内在性 Hx 類を除去し、これを粗酵素液とした。粗酵素液の pH を 50% (v/v) 酢酸水溶液を用いて 4.8 に調整し、そのまま 4 °C で約 2 時間放置した。この冷却沈降により生じた沈殿を 20,000 *g* で 30 分間遠心分離することにより除去し、上清に含まれるタンパク質を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) であらかじめ平衡化した弱陽イオン交換クロマトグラフィー (Accell Plus CM, Waters) カラム (約 5 ml) に吸着させた。カラムを同じ緩衝液約 20 ml で洗浄後、塩化ナトリウム 0 – 400 mM の直線勾配、または 4.8 – 6.0 の pH 勾配によりタンパク質を溶出した。グルコシダーゼ活性を持つフラクションを 50% (v/v) 酢酸で pH 4.8 に調整後、pH 4.8 の酢酸ナトリウム緩衝液で平衡化した Accell Plus CM カラム (Sep-Pack Vac 1cc, Waters) にタンパク質を吸着させ、50 mM 酢酸ナトリウム (pH 8 程度) 2.5 ml で目的タンパク質を溶出した。さらに、ここで得られた活性画分をゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した [カラム, Superdex 200 HR 10/30; 溶出溶媒, 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)、100 mM 塩化ナトリウム; 流速, 0.5 ml/min]。ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分子量測定には以下のタンパク質を標準タンパク質として用いた: フェリチン (440 kDa)、ヒト IgG (160 kDa)、トランスフェリン (81 kDa)、オブアルブミン (43 kDa)、ミオグロビン (17.6 kDa)。なお、以上に述べた各精製過程においては、2.9 mM DIBOA-Glc および 1.4 mM DIMBOA-Glc を基質としてグルコシダーゼ活性を測定した。また、タンパク質量は Bradford (1976) の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準として行った。

3-2-4. 酵素活性測定

グルコシダーゼ活性は、最終液量 500 μ l の 100 mM クエン酸-200 mM リン酸緩衝液 (McIlvaine 緩衝液) (pH 5.5) 中、2 – 10 μ l の酵素液、30 °C で 3 – 10 分間反応を行うことにより測定した。酵素反応を 50 μ l の 1 *N* 塩酸で停止後、生成したアグリコンを HPLC で分析した [カラム, Wakosil II 5C18 HG (4.6 x 150 mm); 溶出溶媒, 24% (v/v) メタノール / 0.1% (v/v) 酢酸水溶液、または 20 – 60% メタノール直線勾配 (0 – 30 分) / 3% (v/v) 酢酸; 流速, 0.8 ml/min; カラム温度, 40 °C; 検出, 280 nm]。*p*-ニトロフェノール (pNP) 配糖体を基質とした場合は、50 μ l の 6 *N* 水酸化ナトリウムで反応を停止後、生成したアグリコンを吸光度 400 nm で定量することにより酵素活性を測定した。反応液に添加した酵素量および反応時間は、その反応中に反応速度変化が起こらないよう適当に設定した。ミカエリス定数 (K_m) および最大反応速度 (V_{max}) は [s]/v-[s] プロットにより求めた。

3-2-5. 電気泳動および N 末端アミノ酸配列の解析

グルコシダーゼの活性染色には播種後 48 時間のコムギの茎葉部から抽出した粗酵素液を用いた。電気泳動は Davis (1964) の方法に従い、4 °C、未変性状態で (native-PAGE) おこなった (8% ポリアクリルアミド)。電気泳動後、ゲルを McIlvaine 緩衝液 (pH 5.5) 中で 4 °C、30 分間平衡化し、その後、0.5 mM 6-ブロモ-2-ナフチル- β -グルコシド (6BNG) および 10 mM ファストブルー BB 塩 (Fast Blue BB salt) を溶解させた McIlvaine 緩衝液中 (pH 5.5) で暗下、30 °C、2 時間インキュベートした。染色終了後、ゲルを蒸留水で 2 回洗浄し、10% (v/v) メタノール / 10% (v/v) 酢酸水溶液に浸して固定した。基質として蛍光色素 (4-メチルウンベリフェリル- β -グルコシド: 4MUG) を用いた場合は、電気泳動後に上と同じ条件でゲルをインキュベートした後、反応液量の 1/10 量の 1 *N* 水酸化ナトリウム水溶液を添加し、UV ランプ下でバンドを観察した。プロテアーゼ阻害剤のザイモグラムへの影響を検討するためには、酵素液を以下の化合物を含む緩衝液で抽出し、直ちに native-PAGE により分析した; 10 mM 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride, 20 μ M antipain, 1 mM benzamidin, 40 μ M leupeptin, 10 mM 1,10-phenanthroline, and 1 mM *N* α -*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone。

Native-PAGE におけるバンド中に含まれるサブユニット構成の検討には、native-PAGE 後ゲルを CBB で染色し、各バンドを剃刀を用いて切り抜き、Centrilutor (Amicon) を用いてゲル中に含まれるタンパク質を電気的に溶出した。このタンパク質のポリペプチド構成は、Laemmli (1970) の方法に従い SDS-PAGE により分析し、銀染色法により確認した。

ポリペプチドの N-末端アミノ酸配列の解析のためには精製タンパク質を SDS-PAGE に供した後 PVDF 膜にブロットイングし、CBB により染色した。その後、60 および 58 kDa ペプチドを切り抜き、そのままプロテインシーケンサーに供することで N-末端アミノ酸配列の解析を行った (HP G1005A Protein Sequencing System)。

3-3. 結果

3-3-1. グルコシダーゼ活性のコムギ芽生えにおける動態

コムギ（アサカゼコムギ）の芽生えにおいて、HxGlc（DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc）が一過的に高濃度で発現しているという過去の報告 [Nakagawa *et al.* 1995] に基づき、同じ時期における HxGlc グルコシダーゼ活性の経時変化を、茎葉部・根部それぞれより調製した粗酵素液を用いて測定した。

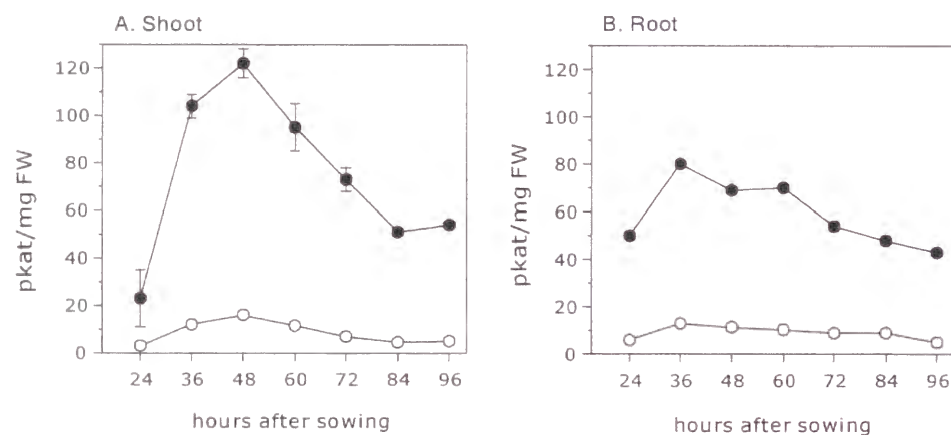


図 3-1. コムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼ活性の経時変化
(○): DIBOA-Glc glucosidase, (●): DIMBOA-Glc glucosidase

図 3-1 に示すように、DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc グルコシダーゼともに、茎葉部では発芽とともに新鮮重あたりの活性が急速に増大し、播種後約 48 時間で最大となった

(DIBOA-Glc グルコシダーゼ: 13 pkat/mg FW、DIMBOA-Glc グルコシダーゼ: 125 pkat/mg FW)。また、根部では播種後約 36 時間後に両活性とも最大となった (DIBOA-Glc グルコシダーゼ: 12 pkat/mg FW、DIMBOA-Glc グルコシダーゼ: 83 pkat/mg FW)。DIMBOA-Glc グルコシダーゼ活性の最大値は、茎葉部において DIBOA-Glc グルコシダーゼの最大値の約 10 倍、根部では約 7 倍であった。また、反応の至適 pH は両基質に対して 5.5 であった。ここで得られたグルコシダーゼ活性の消長と、過去に報告のある HxGlc の消長パターン [Nakagawa *et al.* 1995] との間には時間的な相関が認められた。

3-3-2. コムギ芽生えからのグルコシダーゼの精製

播種後 48 時間のコムギ茎葉部より調製した粗酵素液の pH を 4.8 に調整し、4 °C で約 2 時間放置することにより、その上清部分のグルコシダーゼの比活性は DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc に対して 4–5 倍上昇した。そこで得られた上清を陽イオン交換クロマトグラフィー (Accell Plus CM) 担体に吸着させた後、0–400 mM の塩化ナトリウム直線勾配でタンパク質を溶出した。そして、各フラクションの活性測定および SDS-PAGE による含有ポリペプチドの分析を行ったところ、60 および 58 kDa のポリペプチドがグルコシダーゼ活性の変化とよく一致していた (図 3-2)。

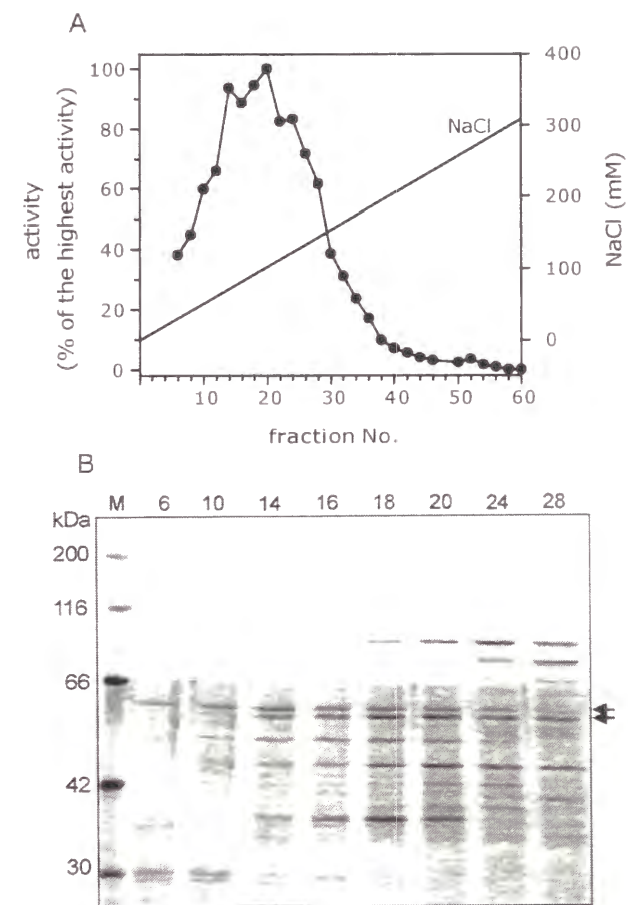


図 3-2. 弱陽イオン交換クロマトグラフィー (Accell Plus CM) における各フラクションの DIMBOA-Glc グルコシダーゼ活性 (A) と SDS-PAGE (B)。

B における各レーン上の番号は A における各フラクションの番号。B における矢印は 60 および 58 kDa ポリペプチドの位置を示している。M: マーカータンパク質

図 3-2-B に示されるように、より低塩濃度で溶出されたフラクション（フラクション 6 – 10）は 58 kDa のバンドよりもむしろ 60 kDa の方がバンド強度が強く、それとは逆に高塩濃度側（フラクション 24 – 28）では 58 kDa のほうが 60 kDa よりも強かった。これと同様の結果は、この陽イオン交換クロマトグラフィーを塩濃度勾配ではなく pH 4.8 – 6.0 の pH 勾配で行ったときにも得られた。すなわち、低 pH では 60 kDa のバンドが主要バンドであり、高 pH では 58 kDa が主要バンドであった（data not shown）。

陽イオン交換クロマトグラフィーにおける活性フラクションを集め、Superdex 200 によるゲル濾過クロマトグラフィーに供したところ、溶出液量 10.2 ml にグルコシダーゼ活性が 1 ピークとして検出され、分子量マーカータンパク質との比較により、このグルコシダーゼの分子量はおよそ 300 kDa であると推測された。また、この活性フラクションを SDS-PAGE により分析したところ、60 および 58 kDa のバンド 2 本のみが観察された。この結果より、コムギにおけるベンゾキサジノン類配糖体グルコシダーゼは、60 および 58 kDa の 2 種類のサブユニットからなるオリゴマーであることが明らかになった。

表 3-1. グルコシダーゼの精製

	Specific activity (nkat/mg protein)		Recovery (%)		Purification (fold)	
	DIBOA-Glc	DIMBOA-G	DIBOA-Glc	DIMBOA-Glc	DIBOA-Glc	DIMBOA-Glc
Crude	12.1	48.0	100	100	1.0	1.0
Cryoprecipitation	49.0	241.0	93.0	100	4.0	5.0
Accell Plus CM	111.4	653.0	21.4	31.6	9.2	13.5
Superdex 200	672.0	3373	11.9	15.0	55.4	70.0

続いて N-末端アミノ酸配列の解析のため、精製グルコシダーゼを SDS-PAGE に供したのち PVDF 膜にブロットングし、目的バンドのアミノ酸配列を分析した。その結果、両ペプチドとも、Gly-Thr-Pro-(Ser?)-Lys-Pro-Ala-Glu-Pro-Ile-Gly-Pro という全く同じ結果を示した。ここで得られた 12 残基の配列は、トウモロコシのグルコシダーゼ [Esen 1992; Brzobohatý *et al.* 1993] だけでなく、これまで報告のある植物由来グルコシダーゼの配列とは全く類似性を示さなかった。

精製グルコシダーゼを 8% 分離ゲルを用いて native-PAGE により分析した際、通常の 1.5

時間の泳動時間で分析を行うとゲルの陰極側末端にやや幅の広いバンドのみが確認された

(data not shown)。しかし、この分析条件下ではバンドの移動度が低く解像度が良好でなかったため、これが単独のバンドであるか、もしくは複数のバンドの集合体なのかは不明であった。そこで、泳動時間を 4 時間に延長し、再度電気泳動（native-PAGE）を行った。その結果、図 3-3-A に示すとおり、分子量約 270 – 330 kDa の箇所には 7 本（バンド 1 – 7）および約 600 kDa の箇所には 1 本（バンド 8）の計 8 本のバンドが明瞭に観察され、コムギグルコシダーゼには複数のアイソザイムが存在することが示された。次に、各アイソザイムが 60 および 58 kDa のどちらのサブユニットから構成されているのかを明らかにするため、上で得られた native-PAGE ゲルから各バンドを切り抜き、ゲル中に含まれるタンパク質を電気的に溶出した後、SDS-PAGE により含有ポリペプチドのバンド強度を比較した（図 3-3-B）。その結果、図 3-3-A のバンド 1 および 2（レーン 1 および 2）は 60 kDa のバンドの方が強く、逆にバンド 5 – 7（レーン 5 – 7）は 58 kDa の方が強かった。そしてバンド 3 および 4（レーン 3 および 4）はどちらのバンド強度もほぼ同程度であった。以上の結果より、コムギ芽生え中には複数タイプのヘテロオリゴマーが存在することが示唆された。すなわち、図 3-3-A のバンド 1 および 2 のアイソザイムは主に 60 kDa のモノマー、バンド 5-7 は主に 58 kDa のモノマー、そしてバンド 3 および 4 に相当するアイソザイムはほぼ等量の 60 および 58 kDa のモノマーから構成されていることが示唆された。

この図 3-3 で得られた結果は、先の陽イオン交換（Accell Plus CM）クロマトグラフィーにおける各フラクションの SDS-PAGE の結果とも矛盾しないものである。すなわち、より負の電荷を帯びたタンパク質（つまり native-PAGE 上で高い移動度を持ち、陽イオン交換体による保持が弱いアイソザイム）は主に 60 kDa モノマーから構成され、逆に負電荷の弱いタンパク質（native-PAGE 上での移動度が低く、陽イオン交換体により強く保持されるアイソザイム）は 58 kDa モノマーから主に構成されているといえる。しかし、ゲル濾過および native-PAGE に基づく分子量の推定は、特にその分子量が大きい場合には信頼性が低いため、コムギのグルコシダーゼを構成しているサブユニットの数を正確に決定することは出来なかった。

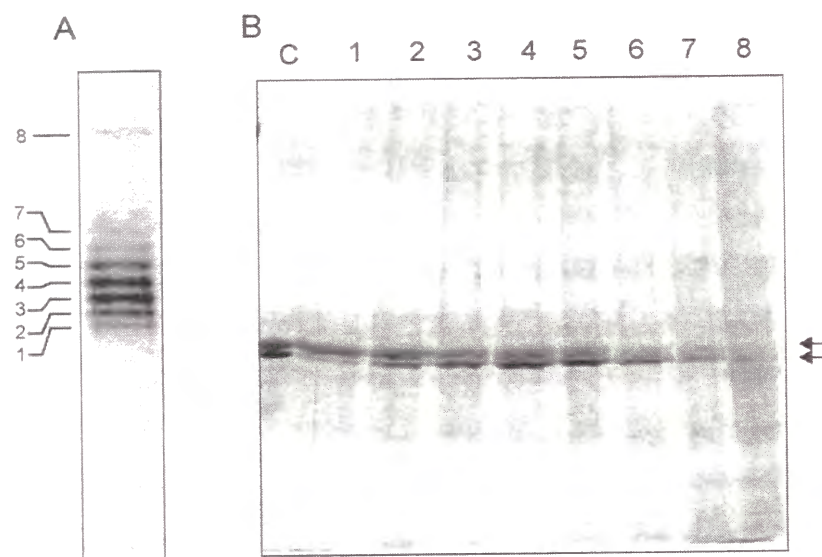


図 3-3. 精製酵素のnative-PAGE (A) およびゲルより溶出した各アイソザイムのSDS-PAGE (B)

A は CBB による染色。バンド 1-7 は分子量約 270-330 kDa、バンド 8 は約 600 kDa。B は銀染色法による染色。各レーン上の数字は A でのバンド番号に相当。レーン上の C はゲル濾過後の精製酵素。右の矢印は 60 および 58 kDa ポリペプチドの位置。

3-3-3. グルコシダーゼの基質特異性

表 3-2 に示す化合物について、 K_m 値および V_{max} 値を求めた。その結果、DIMBOA-Glc に対する V_{max} 値が 4100 nkat/mg protein、 K_m 値が 0.27 mM となり、DIMBOA-Glc が最もよい基質であることが明らかになった。本酵素は DIBOA-Glc に対しても活性を示したものの ($V_{max}=1060$ nkat/mg protein)、その K_m 値は DIMBOA-Glc の約 5 倍程度であった ($K_m=1.34$ mM)。また、DIMBOA-Glc の *N*-デオキシ類縁体である HMBOA-Glc およびエスクリンに対する V_{max} 値は DIMBOA-Glc よりもかなり小さいものであったが、 K_m 値はほぼ同程度であった。人工基質の中では、pNP-β-フコースが最もよい基質であり ($V_{max}=1080$ nkat/mg protein, $K_m=0.67$ mM)、pNP-β-ガラクトースおよび pNP-β-キシロースに対する活性は低いものであった。また、pNP-α-グルコースおよびサリシンに対しては、ほとんど活性が見られなかった。フラボノイドおよびイソフラボノイドは反応液への溶解度が低かったため K_m および V_{max} 値を求めることは出来なかったが、ゲニステイングルコシド 0.05 mM における酵素活性 (420 nkat/mg

protein) は同濃度の DIMBOA-Glc に対する活性とほぼ同等であった。しかし、アピゲニン、ルテオリン、およびホルモノネチンの各配糖体に対しては、ゲニステイングルコシドよりも低い活性しか示さなかった。

市販されているスイートアーモンド由来グルコシダーゼは、pNP-β-グルコシドをよい基質とすることが報告されているが [Grover and Cushley 1977]、この酵素は HxGlc に対して非常に低い活性しか示さなかった (DIBOA-Glc: $V_{max}>4$ nkat/mg protein, $K_m>3$ mM; DIBOA-Glc: $V_{max}>0.6$ nkat/mg protein, $K_m>3$ mM)。

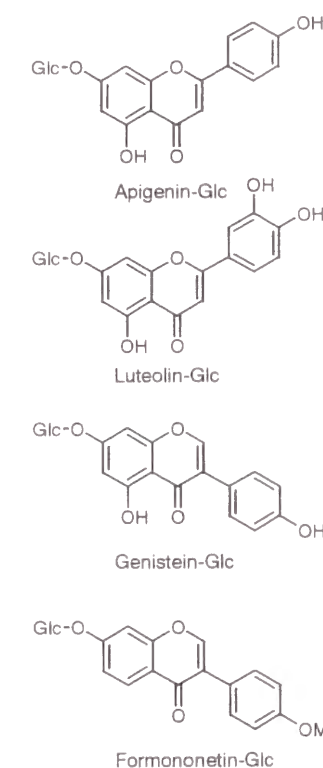
表 3-2. グルコシダーゼの基質特異性

	V_{max} (nkat/mg protein)	K_m (mM)
DIBOA-Glc	1060	1.34
DIMBOA-Glc	4100	0.272
HBOA-Glc	220	2.02
HMBOA-Glc	540	0.320
Esculin	320	0.240
Salicin	n.d. ^a	n.d. ^a
pNP-β-Glc	520	1.70
pNP-β-galactoside	47	1.78
pNP-β-xyloside	35	3.11
pNP-β-fucoside	1080	0.67
pNP-α-glucoside	6 ^b	
Apigenin-Glc	39 ^c	
Luteolin-Glc	84 ^c	
Formononetin-Glc	160 ^c	
Genistein-Glc	420 ^c	

^a Not detected

^b Activity at 2 mM

^c Activity at 0.05 mM



3-3-4. グルコシダーゼアイソザイムの品種・種による発現パターンの比較

これまでの SDS-PAGE および native-PAGE の結果より、コムギ芽生えにおけるグルコシダーゼには複数のアイソザイムが存在することが示唆された。そこで次に、これらアイソザイムの発現パターンをザイモグラムによりコムギ品種・種間で比較した。植物材料としては、*Triticum aestivum* を 3 品種（Asakazekomugi, Chinese Spring, Norin 61）の他に 2 種の *Triticum* (*T. spelta* および *T. turgidum*) を用いた。

各植物材料より調製した粗酵素液を native-PAGE により分析した後、6BNG および Fast Blue BB salt とともにインキュベートすることによりグルコシダーゼ活性を持つバンドを染色した。この染色方法は、基質である 6BNG がグルコシダーゼにより加水分解され、そこで生じたアグリコンと Fast Blue BB salt がカップリングすることにより不溶性の色素が生じることを利用した染色方法である。アサカゼコムギより調製した粗酵素液および精製酵素を、この染色法により分析したところ、両者とも同じ結果が得られた (data not shown)。また、プロテアーゼ阻害剤存在下で酵素液を調製した場合でも、得られるバンドには変化が見られなかった。さらに、粗酵素液を蛍光基質である 4MUG で染色した場合にも同様の結果が得られた (data not shown)。以上の結果より、この条件下では 3-3-2 節において精製した HxGlc グルコシダーゼのみが染色されること、そしてゲル上で観察される複数のバンドは抽出過程で生じた人為的産物ではないことが示された。なお、今後の解析には、より明瞭なバンドが観察された 6BNG を用いる方法を採用した。

図 3-4 に示すように、*T. aestivum* の 3 品種については同じ移動度のバンドが観察された (図 3-4、レーン 1-3)。レーン 1 (アサカゼコムギ) とレーン 2 (Chinese Spring) では全く同じ位置に 7 本の明瞭なバンドが確認されたが、それぞれのバンド強度には多少の差違が認められた (すなわち、より陽極側のバンドがレーン 1 では濃いのに対し、レーン 2 では陰極側のバンドの方が濃かった)。レーン 3 (Norin 61) のバンドは明瞭さに欠けたため、バンドの数を特定することが出来なかった。*T. spelta* においては *T. aestivum* よりもより移動度の高い位置に、バンドが集合して観察された (レーン 4)。また、A および B ゲノムのみからなる 4 倍体コムギ、*T. turgidum* では、1 本の濃いバンドおよび薄く不明瞭なバンド (ゾーン) が観察された (レーン 5)。しかし、これらに関してもバンドが明確でなかったために、その数を特定することが出来なかった。

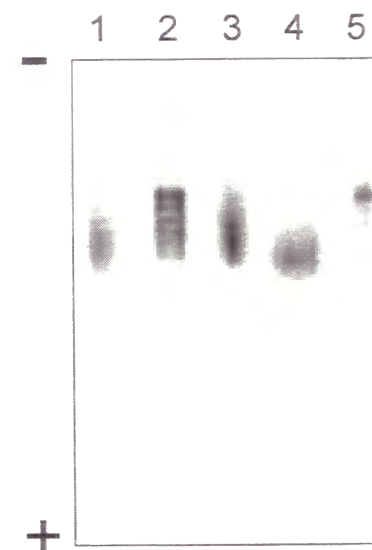


図 3-4. コムギグルコシダーゼのザイモグラム

粗酵素液を native-PAGE で分析した後、グルコシダーゼの活性染色を行った。

レーン 1, *T. aestivum* cv. Asakazekomugi; レーン 2, *T. aestivum* cv. Chinese Spring, レーン 3, *T. aestivum* cv. Norin 61; レーン 4, *Triticum spelta*; レーン 5, *Triticum turgidum* cv. Langdon

3-4. 考察

図 3-1 で示したとおり、コムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼ活性は、HxGlc 類 [Nakagawa *et al.* 1995] と同調して変化しており、特に DIMBOA-Glc に対して高い活性を示すものであった。HxGlc 類はコムギの発芽直後の時期において非常に高濃度で発現しており、この時期に最も多量に存在する二次代謝産物である。このことから、植物体内におけるこのグルコシダーゼの最も主要な基質は HxGlc 類であると考えられ、植物組織の破壊に際し HxGlc が本酵素により加水分解され、直ちに有毒な Hx が高濃度で発現するものと推測される。

表 3-2 に示すように、HBOA-Glc や HMBOA-Glc といったラクタム配糖体に対する活性は、ヒドロキシサム酸 (DIBOA-Glc や DIMBOA-Glc) に対する活性よりも低かった。 K_m 値にはそれほど差が認められなかったにもかかわらず V_{max} 値は 5–8 倍程度小さいものであったことから、*N*-ヒドロキシ基は K_m 値よりもむしろ V_{max} 値により大きな影響を及ぼすということが示唆された。人工基質である pNP 配糖体に対する活性は、トウモロコシ由来グルコシダーゼの結果とほぼ同様であり [Babcock and Esen 1994]、コムギグルコシダーゼの場合も酵素活性発現には糖部分の構造が重要であることが明らかになった。また、イネ科には通常存在しないイソフラボノイド配糖体のゲニステイングルコシドが比較的良好な基質であったことは、非常に興味深い結果であった。イソフラボノイド配糖体のゲニステイングルコシドとホルモノネチングルコシドがフラボノイド配糖体よりも高い活性を示したことから、B 環の位置が重要であると考えられる。植物由来のグルコシダーゼの多くは、基質のアグリコン部分に対する特異性が緩やかなものが多いが、一部の酵素、特にシアン含有化合物の配糖体グルコシダーゼの中にはアグリコン部分に対して非常に高い特異性を示すものが報告されている [Hösel and Conn 1982]。本研究で得られた結果も、この場合と同様にグルコシダーゼ活性発現におけるアグリコン部分の構造の重要性を示すものであると思われる。

Triticum aestivum より調製したグルコシダーゼの native-PAGE では、分子量約 270–330 kDa 程度の 7 本のバンドが確認できたが、Esen らは同様の現象を近交系トウモロコシより酸性 (pH<6) 条件下で抽出したグルコシダーゼについて報告している [Esen and Cokums 1991]。しかし、観察される複数のバンド数が経時的に変化すること、そして SH-プロテアーゼ阻害剤を添加することによりバンドの生成が抑制されることから、彼らはこれら複数のバンドが抽出過程における人為的産物であると結論づけた。しかし、本研究でのコムギにおける複数のバンドは、SH-プロテアーゼ阻害剤存在下で抽出後直ちに電気泳動に供した場

合でも明瞭に確認することが出来た。このことから、コムギグルコシダーゼは Esen らの報告したトウモロコシのグルコシダーゼとは異なり、植物体内に複数のアイソザイムを持つものと推測された。

ゲル濾過および電気泳動の結果から、この時期のコムギには 60 および 58 kDa のサブユニットから構成されるヘテロオリゴマーのグルコシダーゼが存在することが示された。このことから native-PAGE において複数のバンドが見られる理由の一つとして、各アイソザイム間の分子量の違いを挙げることができる。この分子量の違いは、異なった分子量のサブユニットが様々な割合でオリゴマーを構成することにより生じるものである。しかし、どのような機構により各サブユニットが集合して、オリゴマーを構成するのかは今のところ明らかになっていない。トウモロコシグルコシダーゼは 60 kDa サブユニットからなるホモ二量体であり、その二量体構築に関わる遺伝子座は 60 kDa サブユニットをコードする遺伝子座とは異なるということが示唆されている [Frova 1994]。このことは、コムギグルコシダーゼに関する研究においても有益な情報となりうると考えられるが、コムギ (*T. aestivum*) はトウモロコシとは異なり 6 倍体植物であるため、状況は一層複雑であると思われる。

2 品種の *T. aestivum* (アサカゼコムギと Chinese Spring) のザイモグラムでは同じ移動度の複数のバンドが観察されたが、それぞれのバンド強度は品種間で異なっていた。この事実は、先に述べたような可能性、つまり各アイソザイムの発現調節をつかさどる因子が別に存在することを示唆しているのかもしれない。また、3 種の *Triticum* 間では活性染色によるバンド (ゾーン) の移動度が異なり、特に A および B の 2 つのゲノムから構成される 4 倍体コムギ (*T. turgidum*) では、他と比べて非常に狭い範囲しか染色されなかった。これは非常に興味深い結果であり、このことに対する最も単純な説明としては、D ゲノムが存在していないためにグルコシダーゼ遺伝子の一つが欠損している、ということが考えられる。

多くの植物由来グルコシダーゼは、活性中心周辺のアミノ酸配列の相同性から、ファミリー 1 グルコシダーゼに分類されている [Henrissat 1992]。そして、それらの酵素の中には活性中心以外にも類似性を示すものがあり [Akiyama *et al.* 1998]、例えば、トウモロコシグルコシダーゼの cDNA より推定されるアミノ酸配列は、モロコシのグルコシダーゼ (dhurrinase-1) の配列と 70% の相同性を示すことが明らかになっている [Cicek and Esen 1998]。一方で、本研究で得られたコムギグルコシダーゼの N-末端アミノ酸 12 残基の配列は、他の植物由来グルコシダーゼとは全く相同性を示さなかった (ライムギのグルコシダーゼは除く; 次章参照)。しかし、植物グルコシダーゼの N-末端部分は、その全配列の中でも最も保存性の低い

領域ある。この事実を考慮に入れると、今回の結果は必ずしも全配列にわたって他のグルコシダーゼと類似性が低いことを示唆するものではないと考えられる。さらに、これまで報告のあるファミリー 1 グルコシダーゼの結晶構造 [Barrett *et al.* 1995; Burmeister *et al.* 1997; Sanz- Aparico *et al.* 1998] においても、N-末端部分は酵素の表面部分に存在し明確な 2 次構造をとっていないことが示されていることから、N-末端部分は酵素機能にそれほど大きな影響を及ぼしていないと思われる。本研究においてコムギグルコシダーゼの性質としては HxGlc に対する高い活性、酸性の至適 pH、芽生えにおける高レベルでの発現、オリゴマーとしての存在、等が明らかになったが、これらの諸性質はトウモロコシグルコシダーゼにも共通するものである。このことから、コムギおよびトウモロコシグルコシダーゼの基本的な性状は類似しているものと考えられる。

60 および 58 kDa のポリペプチドが全く同一の N-末端アミノ酸配列を示したことに対しては、いくつかの考察が可能である。まず第一に、2 つの異なる遺伝子により 60 および 58 kDa サブユニットが別々にコードされていることが考えられる。しかし、コムギ (*T. aestivum*) は 6 倍体植物であるため、異なるゲノムの遺伝子座でコードされた複数のグルコシダーゼが非常によく似たものであるとしてもそれほど意外ではない。そして、もしこれが事実であるとする、両遺伝子の転写・翻訳は空間的にも時間的にもほぼ同一でなければならず、また、輸送ペプチドも細胞内の同じ部位をターゲットとしていなければならない。しかし、N-末端配列が最も保存性の低い箇所であることを考慮すると、他の可能性もあげることが出来る。つまり、両ペプチドとも元来は同一のものであるが、翻訳後修飾の過程で酵素の C-末端側がプロテアーゼにより切断されて 58 kDa ペプチドが生じるとも考えられる。しかし、いずれの仮定に対しても現在のところは証拠が得られていない。この問題の解明のために、グルコシダーゼ cDNA のクローニングや遺伝子解析などが今後の課題となると思われる。

第四章 ライムギ芽生えにおける β -グルコシダーゼの精製と性状解析

4-1. 序論

これまでも述べてきたように、環状ヒドロキシサム酸 (Hx) のグルコース配糖体 (HxGlc) はコムギ、トウモロコシ、ライムギなどのイネ科植物に蓄積されている耐病性因子であり [Niemeyer 1988]、植物の発芽直後の時期に高濃度で発現している [Nakagawa *et al.* 1995, Ebisui *et al.* 1998]。これまでの Hx 類に関する多くの研究は、主にトウモロコシを用いて行われてきており、コムギやライムギに関する研究は多くない。トウモロコシおよびコムギに含まれる主な Hx 類は DIMBOA-Glc であるが、ライムギにおける主要 Hx 類は DIBOA-Glc である。このことから、Hx 類に関する総合的な知識を得るためには、ライムギについてもトウモロコシなどと同様の情報を得ることが不可欠である。

前章までにおいて、コムギ中の Hx 生合成酵素について様々な性質を明らかにしてきた。そこでこの第四章においては、まず最初にライムギ芽生えにおける Hx 類の動態を明らかにすることを目的とした。そしてさらに、Hx 類による植物の耐病性発現に最も直接的に関与し、なおかつトウモロコシおよびコムギにおいて最もよく研究されている酵素である HxGlc グルコシダーゼの性状解析を行うことにした。

4-2. 実験方法

4-2-1. Hx 類の調製

DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc はそれぞれ、播種後 3 日のライムギ (*Secale cereale* L.) およびトウモロコシ (*Zea mays* L.) の茎葉部より抽出・精製し、それらのアグリコン、DIBOA および DIMBOA は配糖体をグルコシダーゼで加水分解することにより調製した (2-2-1 節参照)。

2-Hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (HBOA) および 2-hydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (HMBOA) は Honkanen ら [Honkanen and Virtanen 1960] の方法に従い合成し、HBOA-Glc および HMBOA-Glc は 2-2-1 節で述べた方法により、それぞれ DIBOA-Glc、DIMBOA-Glc を還元することにより調製した。

4-2-2. 植物材料

ライムギ (*Secale cereale* L.) (品種：春一番) の種子をエタノールで洗浄後、蒸留水でよくすすぎ、蒸留水で湿らせたパーパータオル 2 層の上に播種した。生育は、日長 12 時間、25℃の条件下で行った。

4-2-3. β-グルコシダーゼの精製

以下のすべての精製作業は 4℃で行った。播種後 48 時間のライムギ茎葉部約 5 g を液体窒素により凍結し、磨砕後、新鮮重の 5 倍量の抽出液 (50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0) に懸濁した。懸濁液を 15,000 g で 20 分間遠心分離後、得られた上清に含まれる内在性 Hx 類を限外濾過により除去して粗酵素液を得た。次に粗酵素液の pH を 50% (v/v) 酢酸水溶液で 5.0 に調整した。その後、20,000 g で 30 分間遠心分離して得られた沈殿を 50 mM Bis-Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) に懸濁した。この懸濁液中にふくまれるタンパク質を、同緩衝液であらかじめ平衡化しておいた DEAE-Sepharose カラム (Pharmacia) (約 3 ml) に吸着させ、0、70、350、500 mM の塩化ナトリウムを溶解させた同緩衝液により段階的にタンパク質を溶出した。続いて、塩化ナトリウム 350 mM 画分を脱塩後 Mono Q HR 5/5 カラム (Pharmacia) に吸着させ、そののちに塩化ナトリウムの直線的塩濃度勾配 (150 – 400 mM) によりタンパク質を溶出した [緩衝液, Bis-Tris-HCl (pH 6.8); 流速, 1 ml/min; 溶出液量, 50 ml]。そして、ここで得られた活性画分を Superdex 200 HR 10/30 カラム (Pharmacia) を用

いたゲル濾過クロマトグラフィーに供し、最終的に精製酵素を得た [溶出溶媒, Bis-Tris-HCl (pH 6.8) / 150 mM 塩化ナトリウム; 流速, 0.5 ml/min]。ゲル濾過クロマトグラフィーにおける分子量測定には次のタンパク質を標準として用いた; フェリチン (440 kDa)、ヒト IgG (160 kDa)、トランスフェリン (81 kDa)、オブアルブミン (43 kDa)、ミオグロビン (17.6 kDa)。各精製段階におけるグルコシダーゼ活性の測定には、基質として 1.5 mM の DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc を用いた。タンパク質濃度は Bradford [1976] の方法に従い、ウシ血清アルブミンを標準として求めた。

4-2-4. 酵素活性測定

β-グルコシダーゼ活性は 100 mM クエン酸-200 mM リン酸緩衝液 (McIlvaine 緩衝液) 中で、3-2-4 節で述べたのと同じ方法により測定した。

4-2-5. 電気泳動および N-末端アミノ線配列の解析

β-グルコシダーゼの活性染色、SDS-PAGE、および N-末端アミノ酸配列は、3-2-5 節で述べたのと同様の方法を用いて行った。

4-3. 結果

4-3-1. 環状ヒドロキシサリシン酸配糖体 (HxGlc) および HxGlc グルコシダーゼのライムギ芽生えにおける動態

本研究における生育条件下では、使用したライムギは播種後約 10 時間で発芽を開始し、約 30 時間後に緑化し始めた。発芽直後の時期において、Hx 類の発現を経時的に測定した結果、茎葉部では DIBOA-Glc のみが検出された。図 4-1 に示すように、DIBOA-Glc の濃度は発芽直後から急速に増大し、播種後約 36 時間で最大となった (21 nmol/mg FW)。そして、独立栄養期に移行していくに従ってその濃度は次第に減少していき、最大値の約 1/2 程度でほぼ一定濃度となった。一方、根部では DIBOA-Glc だけでなく DIMBOA-Glc も同様に検出された。DIBOA-Glc は発芽とともに発現し、播種後 24 時間で最大値となった (7.1 nmol/mg FW)。また、DIMBOA-Glc 濃度は緩やかに増加し続け、播種後 60 時間後に 3.3 nmol/mg FW に達した。

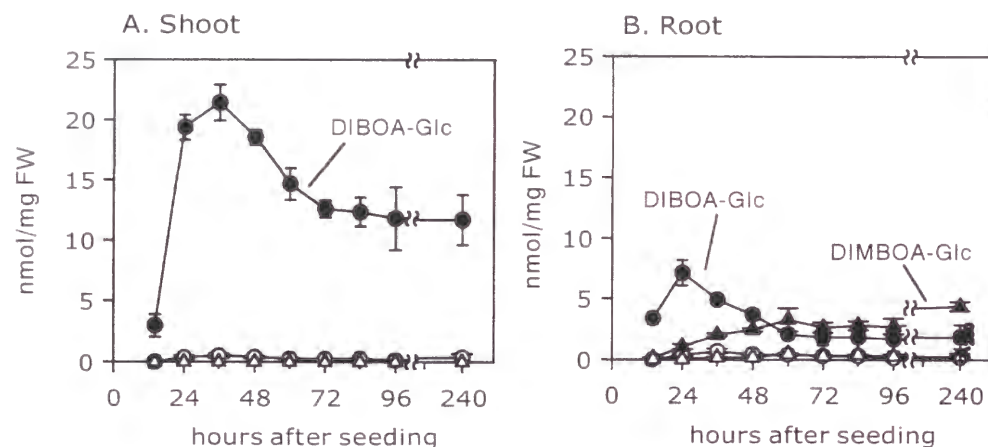


図 4-1. ライムギ芽生えにおけるHx類の経時変化

●: DIBOA-Glc, ○: DIBOA, ▲: DIMBOA-Glc, △: DIMBOA

続いて、両 HxGlc を加水分解しアグリコンを遊離させる機能を持つグルコシダーゼ活性を測定した。両酵素活性とも発芽とともに発現し、茎葉部・根部の両方で播種後 36 時間後に最大値となった (茎葉部: DIBOA-Glc, 410 pkat/mg FW; DIMBOA-Glc, 320 pkat/mg FW, 根部: DIBOA-Glc, 150 pkat/mg FW; DIMBOA-Glc, 105 pkat/mg FW)。その後独立栄養期に

移行するに従い活性は低下し、播種後 84 時間では酵素活性は最大値のおよそ半分になった (図 4-2)。また、両酵素活性は茎葉部・根部の両方において播種後 84 時間までの間平行して推移した。

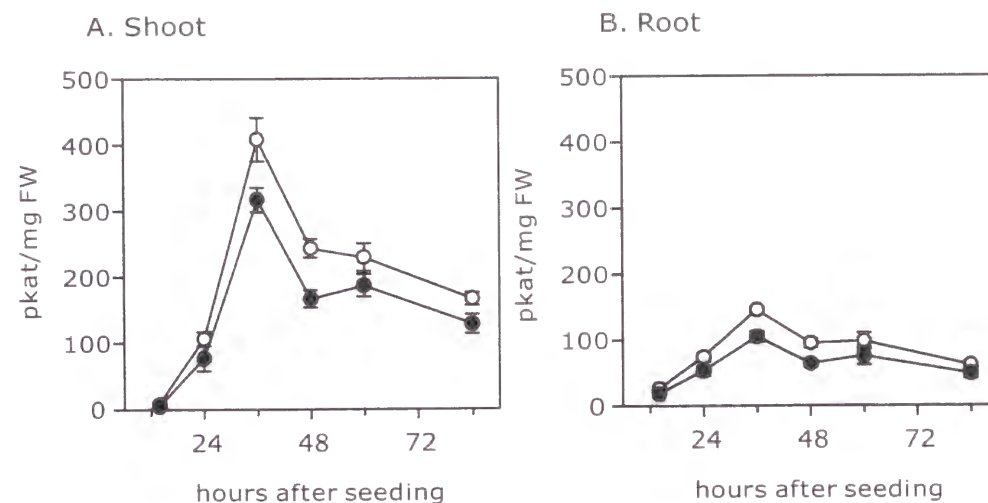


図 4-2. ライムギ芽生えにおけるHxGlcグルコシダーゼ活性の経時変化

○: DIBOA-Glc グルコシダーゼ, △: DIMBOA-Glc グルコシダーゼ

4-3-2. ライムギ芽生えからの β -グルコシダーゼの精製

前節において、HxGlc および HxGlc グルコシダーゼが発芽間もない時期に高レベルで発現していることが明らかになった。そこで次に、播種後 48 時間のライムギ茎葉部より HxGlc グルコシダーゼの精製を行った。

播種後 48 時間のライムギ茎葉部を抽出後、抽出液の pH を 50% (v/v) の酢酸水溶液で 5.0 に調製した。この際、ほとんどすべてのグルコシダーゼ活性は、上清ではなく沈殿画分に検出された。そこでこの沈殿を 50 mM Bis-Tis-HCl 緩衝液 (pH 6.8) に再懸濁後、懸濁液を DEAE-Sepharose を用いた弱陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。タンパク質は、70、350、500 mM の塩化ナトリウムにより段階的に溶出し、活性の検出された 350 mM 塩化ナトリウム画分をさらに Mono Q を用いた強イオン交換クロマトグラフィーで精製した。その結果、図 4-3 に示すように DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc グルコシダーゼ活性が複数のピークとして検出された。また、両酵素活性の溶出パターン (ピーク形状) は全く同一であった。次に、ここでの最大活性フラクション (図 4-3 のフラクション 24 および 25) を一つにまとめ、引

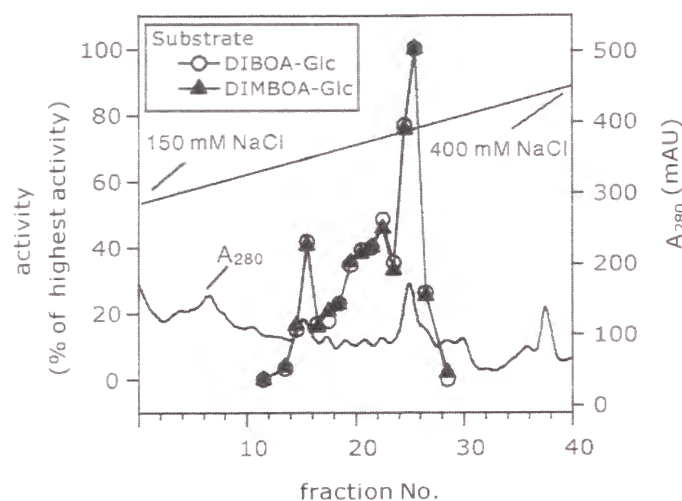


図 4-3. 強陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q)

それぞれのフラクション容量は 1 ml。影付きは、さらに Superdex 200 による精製に供したフラクション (フラクション 15、フラクション 24-25)。○: DIBOA-Glc グルコシダーゼ、▲: DIMBOA-Glc グルコシダーゼ

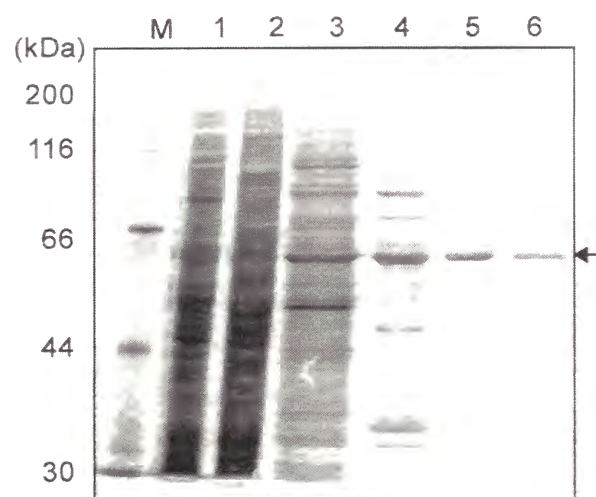


図 4-4. 各精製段階における活性フラクションの SDS-PAGE

レーン 1, 粗酵素液; レーン 2, 等電点沈殿; レーン 3, DEAE-Sepharose; レーン 4, Mono Q; レーン 5, Superdex 200 (Mono Q のフラクション 24-25); レーン 6, Superdex 200 (Mono Q のフラクション 15)

引き続き Superdex 200 によるゲル濾過クロマトグラフィーに供した。標準タンパク質より分子量を測定した結果、グルコシダーゼの分子量はおよそ 300 kDa と推定され、DIBOA-Glc およ

び DIMBOA-Glc の両基質に対して最終的におよそ 45 倍の生成が達成された (表 4-1)。また、SDS-PAGE (銀染色法により染色) 上では分子量 60 kDa のバンドのみが検出された (図 4-4)。

表 4-1. ライムギグルコシダーゼの精製

	Specific activity (nkat/mg protein)		Recovery (%)		Purification (fold)	
	DIBOA-Glc	DIMBOA-Glc	DIBOA-Glc	DIMBOA-Glc	DIBOA-Glc	DIMBOA-Glc
粗酵素	42.0	53.0	100	100	1.0	1.0
等電点沈殿	110.4	172.0	77.1	94.6	2.6	3.2
DEAE-Sepharose	165.3	223.0	73.5	78.1	3.9	4.2
Mono Q	1033	1538	19.2	22.6	24.6	28.9
Superdex 200	1922	2322	9.6	9.2	45.8	43.6

次に、精製したライムギグルコシダーゼの N-末端アミノ酸配列を解析したところ、その配列は Gly-Thr-Pro-Ser-Lys-Pro-Ser-Glu-Pro-Ile-Gly-Pro-Val-Phe-Thr-Lys-Leu-Lys-Pro-Trp であることが明らかになった。この配列は前章 (第三章) で示したコムギグルコシダーゼの N-末端アミノ酸 12 残基の配列と第 7 番目の残基以外は同一であったが (Ser がコムギでは Ala)、コムギ以外の既知の植物グルコシダーゼとは全く類似性を示さなかった。Mono Q クロマトグラム上の 2 番目に大きい活性ピーク (図 4-3 のフラクション 15) に関しても、先と同様に Superdex 200 によるゲル濾過クロマトグラフィーで精製を行ったところ、分子量が約 300 kDa、SDS-PAGE 上で 60 kDa の単一バンドという同様の結果が得られた (図 4-4)。

さらに、Mono Q クロマトグラム上で観察された複数の活性ピークについて、各フラクションに含まれるポリペプチドの比較を native-PAGE および SDS-PAGE により行った。図 4-5A に示すように、すべてのフラクションについて SDS-PAGE ゲル上で 60 kDa のポリペプチドが観察された。また、native-PAGE ゲル上でもおよそ 300 kDa のバンドがすべてのフラクションにおいて観察された (図 5B)。先ほどまでの結果から、この約 300 kDa のバンドがグルコシダーゼに相当すると推測されたが、これらのバンドの移動度はフラクションごとに少しずつ異なり、より高濃度で溶出されたフラクションほどその移動度は大きかった。以上の結果から、ライムギには電氣的状態の異なる複数のグルコシダーゼアイソザイムが存在することが示唆された。また、粗酵素液を抽出後直ちに native-PAGE により分析し、グルコシダーゼを活性染色により検出を試みたところ、上と同じ移動度の複数のバンド (ゾーン) が観察された (図 4-5B)。このことから先の native-PAGE 上のバンドがグルコシダーゼであることが確認された。

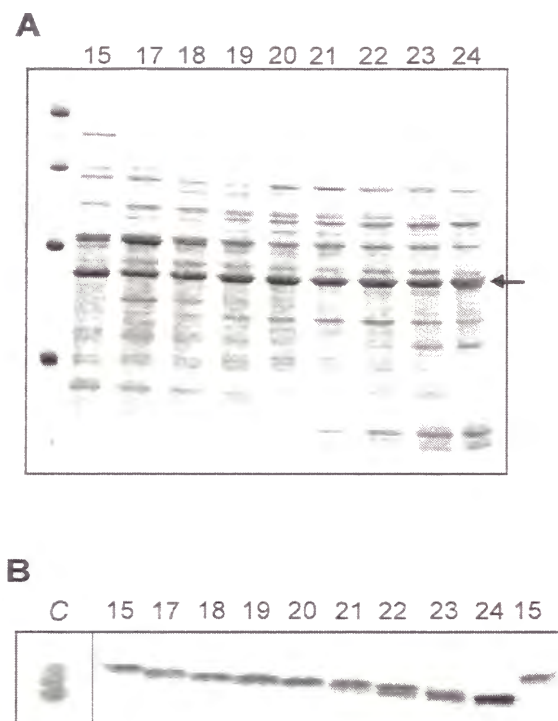


図 4-5. 各 Mono Q フラクシンの SDS-PAGE (A) および native-PAGE (B)
ゲル上の数字は Mono Q クロマトグラフィーでのフラクション番号を表す。A
における矢印は、60 kDa ポリペプチドの位置を示す。B において、C は粗
酵素液を活性染色したもの。

4-3-3. ライムギグルコシダーゼの性状解析

前節の強陰イオン交換クロマトグラフィーにおける最大活性ピーク（図 4-3 のフラクション 24 および 25）を、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した精製グルコシダーゼ（図 4-4. レーン 5 に相当）を用い、性状解析を行った。

反応至適 pH、等電点、反応至適温度はそれぞれ 5.5、4.9 – 5.1、25 – 30 °C であった。次に、金属イオン、キレーター（EDTA）、カスチノスベルミンの効果を表 4-2 に示す。このとき、これまでの活性測定において用いてきた反応液（McIlvaine 緩衝液）中で反応を行うと金属陽イオンと緩衝液中のリン酸が不溶性の塩を形成する。そこで、この実験においては McIlvaine 緩衝液の代わりに酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）を使用した。表 4-1 に示すとおり β -グルコシダーゼの阻害剤として知られるカスチノスベルミン [Saul *et al.* 1984] は 0.2 mM

において完全に酵素活性を抑制したが、一方で EDTA は全く活性に変化を与えなかった。また、1 価陽イオンの Ag^+ は 0.2 mM で完全阻害、2 価イオンの Cu^{2+} も強い阻害活性を示した（0.5 mM で 98% の阻害）。その他の 2 価イオンの中では、 Zn^{2+} が 34% 活性を阻害した。

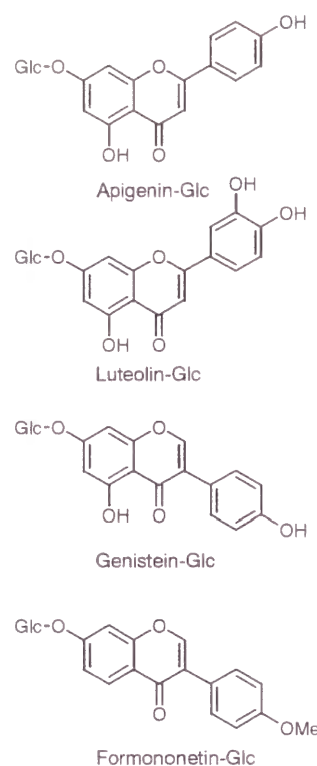
表 4-2. カスチノスベルミン、EDTA、
および金属陽イオンの効果

	Relative activity (%)
Control	100
EDTA (0.5 mM)	101
Castanospermine (0.2 mM)	0
Ag^+ (0.2 mM)	0
Cu^{2+} (0.5 mM)	1.6
Mn^{2+} (0.5 mM)	89.7
Fe^{2+} (0.5 mM)	92.7
Zn^{2+} (0.5 mM)	66.6
Ca^{2+} (0.5 mM)	101
Mg^{2+} (0.5 mM)	91.2

続いて、表 4-3 に示す化合物に対して、それぞれの V_{\max} 値および K_m 値を求めた。その結果、DIMBOA-Glc が供試化合物の中で最も良好な基質であることが明らかになった（ $V_{\max} = 4952$ nkat/mg protein, $K_m = 0.617$ mM）。また、その 7-デメトキシ体である DIBOA-Glc もよい基質であった。しかし、DIBOA-Glc に対する V_{\max} 値は 5870 nkat/mg protein と供試化合物中最大である一方で、その K_m 値は DIMBOA-Glc のおよそ 2 倍であった（ $K_m = 1.19$ mM）。また、ラクタム配糖体の HBOA-Glc および HMBO-Glc に対する V_{\max} 値はそれぞれ 1420 nkat/mg protein および 1005 nkat/mg protein であり、 K_m 値は 2.0 mM および 0.89 mM であった。Hx 類縁体以外では、エスクリンおよび人工基質である pNP- β -グルコースおよび pNP- β -フコースに対しても高い活性を示した。しかし、 α -グルコース体（pNP- α -グルコース）およびサリシンに対しては、ほとんどもしくは全く活性を示さなかった。フラボノイドおよびイソフラボノイド配糖体のなかではゲニステイングルコシドに対して最も高い活性を示した（濃度 0.05 mM で 837 nkat/mg protein）。

表4-2. グルコシダーゼの基質特異性

	V_{\max} (nkat/mg protein)	K_m (mM)
DIBOA-Glc	5870	1.19
DIMBOA-Glc	4952	0.617
HBOA-Glc	1420	2.0
HMBOA-Glc	1005	0.893
Esculin	974	0.151
Salicin	n.d. ^a	n.d. ^a
pNP- β -Glc	828	0.9
pNP- β -galactoside	70.4 ^b	
pNP- β -xyloside	78.2	3.17
pNP- β -fucoside	1671	0.616
pNP- α -glucoside	11 ^c	
Apigenin-Glc	32.4 ^d	
Luteolin-Glc	49.9 ^d	
Formononetin-Glc	12.9 ^d	
Genistein-Glc	837 ^d	

^a Not detected^b Activity at 4.7 mM, ^c Activity at 2 mM, ^d Activity at 0.05 mM

4-4. 考察

ライムギに含まれる主要な Hx 類縁体は DIBOA-Glc であることが知られており [Niemeyer 1988]、本研究において使用したライムギにおいても、茎葉部では DIBOA-Glc のみが存在することが示された。しかし一方で、根部においては DIBOA-Glc と DIMBOA-Glc の両方が検出された。コムギおよびトウモロコシの発芽直後の時期において、HxGlc 濃度および HxGlc グルコシダーゼ活性が同調的に増減しているということは前章においても示しており [Nakagawa *et al.* 1995; Ebisui *et al.* 1998]、本章で明らかになったライムギにおける HxGlc およびグルコシダーゼの消長もそれらと同様の結果といえる。以上の事実は、これら3つのイネ科植物には、HxGlc および HxGlc グルコシダーゼの発現調節に関わる共通の機構が存在していることを示唆しているのかもしれない。

しかし、グルコシダーゼの性状をこれら植物間で比較した場合、いくつかの相違点も認められる。たとえば、ライムギグルコシダーゼの精製過程において粗酵素液の pH を 5.0 に調整した際、ほとんどの活性はそのときに生じる沈殿画分に検出された。しかしこの結果は、同様の処理をした場合に、沈殿ではなく上清に活性を検出できたコムギやトウモロコシのグルコシダーゼとは異なるものである [前章; Esen 1992]。このような相違を生じる原因としては、各酵素の等電点の違いをまず第一に考えることができるが、今回の場合はそれだけが原因とは考えにくい。なぜならば、確かに等電点の違いはあるものの、その差はそれほど大きいものではないからである (トウモロコシ : 5.2, コムギ : 5.1 – 5.6, ライムギ : 4.9 – 5.1)。今回、その原因については解答を得ることができなかったが、ライムギグルコシダーゼが他植物のグルコシダーゼよりも疎水性が高いことをあるいは示唆しているのかもしれない。

強陰イオン交換クロマトグラフィー (Mono Q) において、そのクロマトグラム上で複数の DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc グルコシダーゼ活性のピークが検出され (図 4-3)、両者のピーク形状はほぼ同一であった。この結果から、ライムギにおける複数のグルコシダーゼアイソザイムの存在を示唆され、また、それらの DIBOA-Glc と DIMBOA-Glc に対する活性には差がないことを示された。また、図 4-1 の茎葉部・根部の両方において DIBOA-Glc グルコシダーゼ活性が DIMBOA-Glc 活性と同レベルで平行して変化していることから、ある特定時期にどちらかの基質のみに特異性の高いアイソザイムが発現しているのではないことが示唆された。

ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200) および SDS-PAGE の結果から、ライムギ

グルコシダーゼは 60 kDa のポリペプチドより構成される分子量およそ 300 kDa のオリゴマーであることが示された。しかし、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定はそれほど信頼性の高いものではないため、オリゴマーを構成しているサブユニットの数を正確に特定することはできなかった。図 4-5 からも明らかなように、Mono Q クロマトグラム上で確認された複数のグルコシダーゼのアイソザイムは、すべて 60 kDa サブユニットからなる約 300 kDa のオリゴマーと考えられる。しかし、native-PAGE 上でみられるわずかな移動度の違いは、それぞれの電気的狀態に差があることを示しているものと思われる。Esen ら [Esen and Cokums 1991] は、近交系トウモロコシより調製した粗酵素液を 25 – 37 °C で数時間インキュベートすると、多様な移動度のグルコシダーゼが native-PAGE 上で観察されることを報告しており、それらはインキュベート中に生じたグルコシダーゼの電気的多様性に起因するもので、天然に存在するものではないと結論づけた。また彼らによれば、低 pH (pH 4 – 6) において観察される複数の明瞭なバンドは SH-プロテアーゼの作用によるものであり、高 pH (> pH 6) で不明瞭なバンド (ゾーン) は他のプロテアーゼの働きによるものである。また、高 pH で生じるこのようなバンド (ゾーン) はプロテアーゼ阻害剤を添加してもその生成を抑制することはできず、粗酵素液調製後ただちに native-PAGE に供したときにのみ発生を防ぐことができる。しかし、本研究においては、調製直後の酵素液を活性染色により分析した場合でも、Mono Q 各フラクションと同様の移動度を持つバンド (ゾーン) を観察することができた (図 4-5b)。このことから、ライムギグルコシダーゼにおいてみられる電気的多様性は、トウモロコシの場合のようなプロテアーゼの作用によるものではないと考えられる。

これまで、ライムギにおいて複数のアイソザイムの存在が示唆されたが、その由来については現段階では何の情報も得られていない。しかし、それを考察する際にはトウモロコシのグルコシダーゼに関する知見を参考とすることができるかもしれない。トウモロコシグルコシダーゼは、60 kDa のポリペプチドよりなるホモ二量体であると考えられている。また、このグルコシダーゼは非常に多形性の遺伝子座によりコードされている [Stuber et al. 1977; Pryor 1978]。このため、雑種系のトウモロコシより調製した粗酵素液を native-PAGE により分析した際には、数本のバンドをゲル上で確認することができる [Stuber et al. 1977; Esen and Cokmus 1990]。これまでのところ、ライムギグルコシダーゼをコードする遺伝子座や、ライムギグルコシダーゼの多形性に関する情報は存在しないが、この酵素が 60 kDa のサブユニットから構成されることを考えれば、図 4-5 でみられたような native-PAGE 上の複数のバンドも、トウモロコシグルコシダーゼと同様な機構により発現しているのかもしれない。また、前章で

明らかになったように、コムギグルコシダーゼも native-PAGE 上で明瞭な複数のバンドを示す。コムギグルコシダーゼは 60 および 58 kDa の 2 種のサブユニットから構成されているものの、その他の点についてはライムギグルコシダーゼと非常に類似点も多く、ライムギグルコシダーゼとコムギグルコシダーゼは相互によく似た酵素であると考えられる。

また、ライムギおよびコムギのグルコシダーゼ N-末端アミノ酸配列は、12 残基目までは一つを除き全く同じ配列を示した (前章参照)。このこともまた、両酵素の類似性を強く示唆するものである。しかし、これらの配列は他の植物グルコシダーゼのアミノ酸配列と全く類似性を示すものではなかった。前章でもふれたように、トウモロコシグルコシダーゼを含む多くの β -グルコシダーゼは、その活性部位周辺のアミノ酸配列からファミリー 1 グルコシダーゼに分類されるが [Henrissat 1991]、N-末端配列の機能発現に対する寄与は非常に低いものであると考えられる。このため、今回明らかになった N-末端アミノ酸配列における差異は、他のファミリー 1 グルコシダーゼとの大きな違いを必ずしも示すものではないと考えられる。

ライムギグルコシダーゼの反応至適 pH および等電点は、トウモロコシおよびコムギのグルコシダーゼと同程度の結果であった [前章; Esen 1992]。しかし、反応至適温度はトウモロコシが 50 °C であるのに対し、ライムギでは 25-30 °C であった。金属陽イオンの影響については、 Ag^+ および Cu^{2+} がライムギグルコシダーゼの活性を強く阻害したが、トウモロコシの場合は Cu^{2+} の阻害は報告されていない [Esen 1992]。DIBOA-Glc および DIMBOA-Glc に対する V_{\max} 値は、それぞれのラクタム (HBOA-Glc および HMBOA-Glc) に対する値と比較して 4 – 5 倍大きかったが、一方で K_m 値は 1.4 – 1.7 倍小さい値だった。このことは、酵素活性発現のためには基質の N-4-ヒドロキシ基が重要であり、その効果は K_m 値よりも V_{\max} 値に大きく現れるということを示唆するものである。そして、このような N-4-ヒドロキシ基の効果は、コムギやトウモロコシのグルコシダーゼにも共通するものであった [前章; Babcock and Esen 1992]。これに対し、7-メトキシ基のライムギグルコシダーゼに及ぼす影響は、コムギやトウモロコシのグルコシダーゼに対するものとは異なる結果であった。コムギやトウモロコシでは、DIBOA-Glc や HBOA-Glc よりもそれぞれの 7-メトキシ類縁体である DIMBOA-Glc や HMBOA-Glc に対してかなり高い活性を示した [前章; Ebisui et al. 1998]。しかし今回の研究では、ライムギグルコシダーゼが 7-メトキシ基の影響をコムギやトウモロコシほど大きく受けているような結果は得られなかった。さらに、pNP-グルコース、pNP-フコース、エスクリン、ゲニステイングルコシドといった Hx 類縁体以外の化合物にも、コムギやトウモロコシのグルコシダーゼと比べて高い活性を示した。以上の結果から、ライムギグルコシダーゼはコムギやトウモロコシの酵素よ

りも基質特異性が低いということが示唆された。特に、ライムギグルコシダーゼが DIMBOA-Glc だけでなく DIBOA-Glc に対しても同様に高い活性を示したことは、ライムギにおける主要 Hx 種が DIMBOA-Glc ではなく DIBOA-Glc であることを考えると重要な意味を持つように思える。

これまで、ライムギ、コムギ、トウモロコシにおけるグルコシダーゼについて、その諸性質を比較してきたが、全般的な性状はいずれの酵素も類似していると考えられる。とくに、ライムギとコムギのグルコシダーゼは非常によく似ているといえるであろう。しかし、それらの間には相違点もいくつか認められ、特にそれは基質特異性において顕著である。なぜこのような基質特異性の相違が生じるのか、そしてなぜ電氣的に多様なアイソザイムが存在するか、ということを解明するための第一歩としては、本酵素の全アミノ酸配列の決定や、それに続くゲノム DNA の解析などがあげられる。そして、そこで得られた結果は、これら植物の進化過程の違いについても何らかの手掛かりを与えるものかもしれない。

総括

環状ヒドロキサム酸 (Hx) 類はイネ科植物に構成的に存在する耐病性因子であるが、植物の発芽直後の時期においては Hx 配糖体 (HxGlc) が傷害や感染とは無関係に一過的に高濃度で発現している。本研究は、このようなイネ科植物の Hx 類発現機構解明の一環として、コムギおよびライムギにおける Hx 生合成酵素の動態と性状を明らかにすることを目的に行われた。

Hx の一つである DIBOA の生合成経路は、インドールを分岐点としてトリプトファン生合成経路と Hx 生合成経路に分かれ、インドール以降はチトクローム P-450 による 4 段階の水酸化反応 (一酸素原子付加反応) である。そこで、第一章ではこの 4 段階の反応のうち最初と最後の酵素反応に注目し、コムギ従属栄養期におけるそれら酵素活性の動態を測定した。その結果、両酵素活性とも Hx 類の消長と同調して経時的に増減していることが明らかになった。また、Hx 類は通常の植物内では不活性なグルコース配糖体として蓄積されている。そこで、第二章および第三章では、アグリコナー配糖体間の反応を触媒するグルコシルトランスフェラーゼおよびグルコシダーゼの酵素活性についても検討した。そして、これらの酵素活性の経時変化と Hx 類の経時変化との間にも時間的な相関が認められ、以上の結果より、コムギにおける HxGlc の一過的な発現はその代謝経路全体の活性化によるものであることが示唆された。

次に、イネ科植物における耐病性発現の調節機構に関する詳細な知見を得るために、この調節に最も直接的に関与する二つの酵素、グルコシルトランスフェラーゼとグルコシダーゼについて精製を行い、その性状解析を行った。

第二章では、コムギのグルコシルトランスフェラーゼは分子量が 49 もしくは 47 kDa のモノマーであることが明らかにされ、さらに、二つのアイソザイムが存在することが示唆された。また、この酵素は DIBOA よりも DIMBOA に対して高い活性を持つことが示されたが、この結果は、コムギにおける主要 Hx 種が DIMBOA であることと矛盾しないものであった。トウモロコシやライムギ由来のグルコシルトランスフェラーゼに関して、酵素レベルでの報告はこれまでごく少数しかないので、それらと本研究で得られた結果を比較したところ、これらのグルコシルトランスフェラーゼの性状には大きな相違点を認めることができなかった。コムギおよびトウモロコシにおける主要 HxGlc が DIBMBOA-Glc であり、ライムギにおける主要化合物が DIBOA-Glc であることを考えると、この結果は興味深いものである。

第三章では、コムギグルコシダーゼの精製と性状解析を行い、この酵素が 60 および 58 kDa の二つのサブユニットから構成される分子量約 300 kDa のヘテロオリゴマーであること、そしてサブユニットの構成比が異なる複数のアイソザイムが存在することが示唆された。このような結果は、トウモロコシグルコシダーゼには見られない新規なものであった。また、3 品種の *Triticum aestivum* 間ではこのアイソザイムの発現パターンに大きな差は認められなかったが、他の *Triticum*、特に 4 倍体コムギでは、アイソザイムの発現が *T. aestivum* とは大きく異なっていた。このグルコシダーゼの基質特異性について詳細に検討した結果、DIMBOA-Glc に対して特に高い活性を示すことが明らかになった。また、コムギグルコシダーゼとトウモロコシグルコシダーゼの基質特異性の比較から、両酵素の基質の認識にはそれほど大きな違いはないことが示唆された。

過去の Hx に関する研究はトウモロコシを主な植物材料として使用しており、コムギやライムギに関する研究は非常に少数であった。そこで本研究においては、第三章までのコムギに関する研究と併せて、第四章ではライムギ従属栄養期における Hx 類の動態を明らかにし、さらにそのグルコシダーゼの性状解析を行った。そして、ライムギにおいても HxGlc および HxGlc グルコシダーゼ活性が同調して変化していることが示され、このような従属栄養期における Hx 生合成酵素の一過的な活性化はイネ科植物に共通の現象であることが示唆された。また、精製されたグルコシダーゼは 60 kDa のサブユニットからなる分子量約 300 kDa のホモオリゴマーであることが明らかになり、さらに複数のアイソザイムの存在が示唆された。また、その N-末端アミノ酸配列がコムギグルコシダーゼの N-末端配列と高い相同性を示したことから、両酵素の類似性が示唆された。しかし、グルコシルトランスフェラーゼの場合とは異なり基質特異性には興味深い違いが認められた。すなわち、ライムギのグルコシダーゼは DIMBOA-Glc だけでなく DIBOA-Glc に対しても同様の高い活性を示した。また、その他の基質に対してもコムギやトウモロコシ由来のグルコシダーゼよりも高い活性を示し、ライムギグルコシダーゼは比較的広い基質特異性を持つことが明らかとなった。

以上のように本研究においては、イネ科植物における Hx 生合成酵素に関して新たな知見を多く得ることができたが、その一方で新たな問題点が残された。例えば複数アイソザイムの由来とその意義、さらに基質特異性における相違の由来を明らかにすることなどがあげられる。本研究で明らかになったグルコシルトランスフェラーゼおよびグルコシダーゼの性状をより詳細に検討し、さらに全アミノ酸配列の決定や遺伝子解析等の分子生物学的手法を導入していくことで、今回提起された問題点に対する解答が得られることが期待される。また、そこ

で得られた結果はコムギ・ライムギ・トウモロコシにおける病害抵抗機構の進化や、さらにはイネ科植物全般の感染防御機構に対する新たな知見に結びつくものと思われる。

引用文献

- Akiyama T., Kaku H., Shibuya N. (1998) A cell wall-bound β -glucosidase from germinated rice: purification and properties. *Phytochemistry* 48: 49-54
- Argandoña V.H., Luza J.G., Niemeyer H.M., Corcuera L.J. (1980) Role of hydroxamic acids in the resistance of cereal to aphids. *Phytochemistry* 19: 1665-1668
- Babcock G.D., Esen A. (1994) Substrate specificity of maize β -glucosidase. *Plant Sci.* 101: 31-39
- Bailey B.A., Larson R.L. (1991) Maize microsomal benzoxazinone *N*-monooxygenase. *Plant Physiol.* 95: 792-796
- Barrett T., Suresh C.G., Tolley S.P., Dodson E.J., Hughes M.A. (1995) The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase. *Structure* 3: 951-960
- Bradford M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262: 1051-1054
- Burmeister W.P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S., Henrissat B. (1997) The crystal structures of *Sinaps alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure* 5: 663-675
- Cicek M., Esen A. (1998) Structure and expression of a dhurrinase (β -glucosidase) from sorghum. *Plant. Physiol.* 116: 1469-1478
- Conn E.E. (1981) Cyanogenic glycosides. In: Stumpf P.K., Conn E.E. eds, The Biochemistry of Plants, vol 7, pp 470-500, Academic Press, New York
- Cuevas L., Niemeyer H.M., Jonsson L.M.V. (1992) Partial purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -D-glucosidase from maize. *Phytochemistry* 31: 2609-2612
- Desai S.R., Kumar P., Chilton W.S. (1996) Indole is an intermediate in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in maize. *Chem. Commun.* 1321
- Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 121: 404-427
- Ebisui K., Ishihara A., Hirai N., Iwamura H. (1998) Occurrence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) and a β -glucosidase specific for its glucoside in maize seedlings. *Z. Naturforsch.* 53c: 793-798
- Esen A. (1992) Purification and partial characterization of maize (*Zea mays* L.) β -glucosidase. *Plant. Physiol.* 98: 174-182
- Esen A. and Cokmus C. (1990) Maize genotypes classified as null at the *glu* locus have β -glucosidase activity and immunoreactive protein. *Biochem. Genet.* 28: 319-336
- Esen A., Cokums C. (1991) pH- and temperature-dependent β -glucosidase multiplicity in maize (*Zea mays* L.) is a proteolysis artifact. *Plant Sci.* 74:17-26
- Esen A., Stetler D.A. (1993) Subcellular localization of maize β -glucosidase. *Maize Genet. Crop News Lett.* 67: 19-20
- Frey M., Kliem R., Saedler H., Gierl A. (1995) Expression of a cytochrome P450 gene family in maize. *Mol. Gen. Genet.* 246: 100-109
- Frey M., Chomet P., Glawischnig E., Stettner C., Grün S., Winklmeier A., Eisenreich W., Bacher A., Meeley R.B., Briggs S.P., Simcox K., Gierl A. (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* 277: 696-699
- Friebe A., Roth U., Kück P., Schnabl H., Schulz M. (1997) Effects of 2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones on the activity of plasma membrane H^+ -ATPase. *Phytochemistry* 44: 979-983
- Frova C. (1994) Tissue specificity and genetic control of the *β -Glu null* phenotype in maize. *Plant Sci.* 102: 171-180
- Glawischnig E., Eisenreich W., Bacher A., Frey M., Gierl A. (1997) Biosynthetic origin of oxygen atoms in DIMBOA from maize: NMR studies with $^{18}O_2$. *Phytochemistry* 45: 715-718
- Glawischnig E., Grün S., Frey M., Gierl A. (1999) Cytochrome P450 monooxygenases of DIBOA biosynthesis: Specificity and conservation among grasses. *Phytochemistry* 50: 925-930
- Grover A.K., Cushley R.J. (1977) Studies on almond emulsin β -D-glucosidase. II. Kinetic evidence for independent glucosidase and galactosidase sites. *Biochim. Biophys. Acta* 482: 109-124
- Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309-316
- Hughes M.A., Brown K., Pancoro A., Murray B.S., Oxtoby E., Hughes J. (1992) A

- molecular and biochemical analysis of the structure of the cyanogenic β -glucosidase (linamarase) from cassava (*Manihot esculenta* Cranz). *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 273-279
- Hofman J., Hofmanová O. (1971) 1,4-benzoxazine derivatives in plants: absence of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one from uninjured *Zea mays* plants. *Phytochemistry* 10: 1441-1444
- Honkanen E., Virtanen A.I. (1960) The synthesis of precursor II of benzoxazolinone formed in rye plants, and the enzymic hydrolysis of precursor I, the glucoside. *Acta Chem. Scand.* 14: 504-507
- Hösel W., Barz W. (1975) β -Glucosidase from *Cicer arietinum* L. Purification and properties of isoflavonone-7-O-glucoside specific β -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 57: 607-616
- Hösel W., Conn E.E. (1982) The aglycone specificity of plant β -glucosidase. *Trends Biochem. Sci.* 6: 219-221
- Jonsson L.M.V., Aarsman M.E.G., Van Diepen J., de Vlaming P., Smit N., Schram A.W. (1984) Properties and genetic control of anthocyanin 5-O-glucosyltransferases in flowers of *Petunia hybrida*. *Planta* 160: 341-347
- Kakes P. (1985) Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta* 166: 156-160
- Kamsteeg J., Van Brederode J., Van Nigtevecht G. (1978) Identification and properties of UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase isolated from petals of the red campion (*Silene dioica*). *Biochem. Genet.* 16: 1045-1058
- Kamsteeg J., Van Brederode J., Van Nigtevecht G. (1978) Identification, properties and genetic control of UDP-glucose: cyanidin-3-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)-glucoside-5-O-glucosyltransferase isolated from petals of the red campion (*Silene dioica*). *Biochem. Genet.* 16: 1059-1071
- Klun J.A., Robinson J.F. (1969) Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *J. Econ. Entomol.* 62: 214-220
- Kho K.F.F., Kamsteeg J., Van Brederode J. (1978) Identification, properties and genetic control of UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Petunia hybrida*. *Z. Pflanzenphysiol.* 88S: 449-464
- Kumar P., Moreland D.E., Chilton W.S. (1994) 2H-1,4-benzoxazine-3(4H)-one, an intermediate in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in maize. *Phytochemistry* 36: 893-898
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Leighton V., Niemeyer H.M., Jonsson L.M.V. (1994) Substrate specificity of a glucosyltransferase and an N-hydroxylase involved in the biosynthesis of cyclic hydroxamic acids in Gramineae. *Phytochemistry* 36: 887-892
- Massardo F., Zúñiga G.E., Pérez L.M., Corcuera L.J. (1994) Effects of hydroxamic acids on electron transport and their cellular location in corn. *Phytochemistry* 35: 873-876
- Melanson D., Chilton M-D., Masters-Moore D., Chilton W.S. (1997) A deletion in an indole synthase gene is responsible for the DIMBOA-deficient phenotype of *bx* maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13345-13350
- Mkpong O.E., Yan H., Chism G., Sayre R.T. (1990) Purification, characterization, and localization of linamarase in cassava. *Plant. Physiol.* 93: 176-181
- Nakagawa E., Amano T., Hirai N., Iwamura H. (1995) Non-induced cyclic hydroxamic acids in wheat during juvenile stage of growth. *Phytochemistry* 38: 1349-1354
- Niemeyer H.M. (1988) Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry* 27: 3349-3358
- Nisius A. (1988) The stromacentre in *Avena* plastids: an aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* 173: 474-481
- Pryor A.J. (1978) Mapping of glucosidase on chromosome 10. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 52: 14
- Reese ET (1977) Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. *Rec. Adv. Pytochem.* 11: 311-364
- Saleh N.A.M., Poulton J.E., Grisebach H. (1976) UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase from red cabbage seedlings. *Phytochemistry* 15: 1865-1868
- Saleh N.A.M., Fritsch H., Witkop P., Grisebach H. (1976) UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyl-transferase from cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Planta* 133: 41-45
- Sanz-Aparicio J., Hermoso J.A., Martínez-Ripoll M., Lequerica J.L., Polaina J. (1998) Crystal structure of β -glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.* 275: 491-502
- Saul R. Molyneux R.J., Elbein A.D. (1984) Studies on the mechanism of castanosperimine inhibition of α - and β -glucosidases. *Arch. Biochem. Biophys.* 230: 668-675
- Stuber C.W., Goodman M.M., Johnson F.M. (1977) Genetic control and racial variation of

β -glucosidase isozymes in maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.* 15: 383-394

Teusch M., Frokmann G., Seyffert W. (1986) Genetic control of UDP-glucose: antocyanin 5-*O*-glucosyltransferase from flowers of *Matthiola incana* R. Br. *Planta* 168: 586-591

Thayer S.S., Conn E.E. (1981) Subcellular localization of dhurrin β -glucosidases and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf brades. *Plant. Physiol.* 67: 617-622

Woodward J., Wiseman A. (1982) Fungal and other β -glucosidases. Their properties and applications. *Enzyme Microbial Technol.* 4: 73-79

Zùñiga G., Argandoña V.H., Niemeyer H.M., Corcuera L.J. (1983) Hydroxamic acid content in wild and cultivated Gramineae. *Phytochemistry* 22: 2665-2668

原著論文

第一章

Tanabe J., Sue M., Ishihara A., and Iwamura H. (1999) "Occurrence and characterization of 2-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one and indole hydroxylases in juvenile wheat", *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**: 1614-1617

第二章

Sue M., Ishihara A., and Iwamura H. "Occurrence and characterization of an UDP-glucose:hydroxamic acid glucosyltransferase in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings", manuscript in preparation

第三章

Sue M., Ishihara A., and Iwamura H. (2000) "Purification and characterization of a hydroxamic acid glucoside β -glucosidase from wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings", *Planta*, in press

第四章

Sue M., Ishihara A., and Iwamura H. (2000) "Purification and characterization of a β -glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings", *Plant Science*, in press

関連論文

Oikawa A., Ebisui K., Sue M., Ishihara A., and Iwamura H. (1999) "Purification and characterization of a β -glucosidase specific for 2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one (DIMBOA) glucosidase in maize", *Z. Naturforsch.* **54c**: 181-185

Nomura T., Sue M., Horikoshi R., Tebayashi S., Ishihara A., Endo T.R., and Iwamura H. (1999) "Occurrence of hordatines, the barley antifungal compounds, in wheat-barley chromosome addition line", *Genes Genet. Syst.* **74**: 99-103

謝辞

本研究は京都大学大学院応用生命科学専攻生物機能制御化学研究室で行ったものであります。本研究を行う機会を与えてくださり、終始御指導と激励を賜りました京都大学大学院農学研究科、岩村淑教授に心から感謝致します。また、研究を進めるにあたり数々の貴重な御助言、御鞭撻を頂きました京都大学大学院農学研究科、三芳秀人助教授並びに京都大学大学院農学研究科、石原亨先生、そして様々なコムギ種子を快く提供して下さいました京都大学大学院農学研究科、遠藤隆教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の共同研究者である田辺純也氏、さらに、本研究を進める上で数多くの御意見、御援助を頂きました当研究室の戒居健吉氏、及川彰氏、野村泰治氏に深く感謝致します。

最後に、日頃より暖かい御支援を下さり、また、相談相手ともなって頂いた京都大学生物機能制御化学研究室の方々に心より御礼申し上げます。